

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Zoología y Antropología Física



TESIS DOCTORAL

**Patrones de diversificación y procesos evolutivos en
cangrejos de río (Crustacea, Astacoidea)**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Carlos Pedraza Lara

DIRECTOR:

José Ignacio, dir Doadrio Villarejo

Madrid, 2015

626899486



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE



5329971342

T595.3
DOA
pat



Facultad de Ciencias Biológicas
Dep. de Zool. y Antropología Física



MINISTERIO
DE CIENCIA
E INNOVACIÓN

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

CSIC

mnch

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

Departamento de Biodiversidad y Biología Evolutiva

Patrones de diversificación y procesos evolutivos en cangrejos de río (Crustacea, Astacoidea).

Memoria presentada por CARLOS SALVADOR PEDRAZA LARA para optar
al grado de

Doctor en Biología



9004725

Vº Bº Director de Tesis
Dr. Ignacio Doadrio Villarejo

Madrid, Enero de 2011

*A Paty
y a mis padres.
Lupita y Heriberto*

AGRADECIMIENTOS

Lo más importante. Agradezco a todas las personas con las que he compartido grandes momentos durante esta tesis, y a muchos más.

En especial, a Ignacio (Nacho, claro). Lo que pueda expresar queda corto para todo lo que me has aportado, en términos personales primero y en los profesionales también. Mi estancia en España me ha marcado en todos sentidos y buena parte de las experiencias que me llevo te las debo. Aparte de compartir tu experiencia y conocimientos en ciencia, me has ofrecido múltiples oportunidades para conocerme, y eso es lo que más valoro. Gracias por tu amistad.

A Paty, desde luego. No lo habría hecho sin ti, ni siquiera el inicio, tú lo sabes. Mil y más gracias por el soporte, porque contigo he podido dar forma a casi todo lo escrito y lo que falta, pero más importante, por hacerme recordar por qué vale la pena lo que uno hace.

A Mario. Esas enriquecedoras discusiones me mostraron a un científico y un amigo invaluable. Me mostraste el valor de lo improbable, insospechado e ilógico, (que con frecuencia es lo más acertado), y que lo mejor para entenderlo es la valentía –o mejor, el descaro- de afrontarlo. Me ensañaste además el valor de ser humano en ciencia y darse cuenta de ello. Gracias también por los refuerzos mexicanos cuando tanta falta hacían.

A Paloma Caudevilla, porque aparte de ser un gran apoyo logístico has sido una amiga imprescindible; en especial, y como saben los amigos, en los momentos duros. Sin duda gente como tú nos hace a muchos la vida mejor.

A Lourdes, por el gran apoyo que me has dado repetidamente; cuando pienso en ti me acuerdo de lo importante que es tener resolución para hacer las cosas. Bien sabes que cuando quieras tendrás un hogar en México y un par de buenos amigos.

A Paloma Garzón, por tu amistad. Tu inteligencia y corazón me enseñaron a ver que vale la pena insistir en lo importante, y en el valor de los ideales.

A Obe, porque tu ayuda desinteresada fue determinante en los momentos clave.

A mi familia, que como a toda familia de biólogo, suele sufrir nuestra terquedad y compartir muestreos y demás. A mi padre, que me enseñó su admiración por la naturaleza, a mi madre de quien sin duda aprendí a hacer las cosas, a Sandra y Heriberto, que me abrieron camino, me ayudaron tantas veces y me impulsaron. También a Dulce, compañera de muestreo y de muestras, por su gran ayuda. A doña Paty y don Tomás, por sus consejos y por su soporte.

A todos mis compañeros en el labo: en especial a Silvia y Fer, también a Chiara, Ernesto, Isa, Felipe, Iker, Jorge, David B., Íñigo, Cristina, Iván, Carlos, Raquel, Patri., David O., Marta, Pilar, Annie (entre otros). Todos formaron una etapa inolvidable en mi vida. Aprendí mucho de ustedes, y lo que aún me queda. A Claudia, por compartir con nosotros momentos complicados para darnos cuenta que al final, vale la pena. A Rafa y a Regina, por compartir consejos muy importantes.

A Guaci, Paul y Alejandro por sus enseñanzas en ciencia y en la forma de solucionar los problemas, en udtedes he visto, entre otras cosas, que la vocación y persistencia son indispensables.

A Keith y Diethard, que me recibieron, apoyaron e impulsaron a hacer lo necesario para lograr una meta. Entre otras cosas no se debe olvidar que la ciencia es humana, y como tal, se basa en la sencillez y honestidad.

A Arley, Melody, Edgar, Reachel, Peter, Inka, Juan Carlos, Anja, Rainer, Rick y tantos amigos más hechos por el camino. Gracias también a Marcos por sus consejos, compañía y amistad. A Stefano, por el apoyo desinteresado y su disponibilidad a compartir. Todos ellos me han enseñado la riqueza de las diferencias, entre tantas, tantas cosas.

A Marta, Borja y Alan, por las fructíferas discusiones y por brindarme una buena amistad, lo único que lamento es que fuera hasta el final de la estancia. Espero que en un futuro nos enfrentemos a unas buenas cañitas (chelas) para continuar la labor. Gracias por los consejos y las sugerencias.

A muchos otros que me hubiera gustado darme más oportunidad de tratar más tiempo, pero que coincidimos poco por la situación de “vicarianza espacial” o temporal del museo: Noe, Gary, Pili, Isa L...

A los pescadores que me ayudaron en repetidas ocasiones, Don Antonio, el Tarzán, el Calavera,... su aportación ha sido fundamental.

Supongo que normalmente una tesis doctoral no es trabajo fácil, y hacerla en un país distinto lo es menos, pero ustedes me ayudaron a llevarlo, de una u otra forma. Nunca dejaré de decirlo, muchas gracias a todos, por todo.

“From causes which appear similar we expect similar effects. This is the sum of our experimental conclusions... but we can not prove the necessity of this conjunction.”

David Hume

An enquiry concerning human understanding (1772)



ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	7
I. INTRODUCCIÓN	13
I.1 Los cangrejos de río: distribución y diversidad	15
I.2 Aspectos filogenéticos de los cangrejos de río	18
I.3 El estudio de la evolución a diferentes escalas	20
I.3.1 Patrones macroevolutivos	21
I.3.2 Patrones microevolutivos	24
I.3.2.1 <i>Estimación de la diferenciación entre poblaciones y flujo genético</i>	25
I.3.2.2 <i>Genética de poblaciones de cangrejos de río</i>	26
I.3.2.3 <i>Filogeografía</i>	27
I.4 Marcadores moleculares	28
I.4.1 ADN mitocondrial	29
I.4.2 Microsatélites	29
I.5 Filogenia y sistemática con marcadores moleculares	32
I.6 Grupos de estudio	34
I.6.1 La subfamilia Cambarellinae	35
I.6.2 El cangrejo de río europeo <i>Austropotamobius italicus</i>	37
II. OBJETIVOS	47
1. ESTRUCTURA MITOCONDRIAL DE LAS POBLACIONES IBÉRICAS DE CANGREJO DE RÍO, <i>AUSTROPOTAMOBIOUS ITALICUS ITALICUS</i> (FAXON, 1914)	51
1.1 Introducción	53
1.2 Métodos	59
1.2.1 Colección de tejidos y de datos	59
1.2.2 Análisis filogenéticos	66
1.2.3 Diversidad genética e historia demográfica	67
1.2.4 Análisis filogeográfico	71
1.2.5 Modelo de aislamiento-mutación	72
1.3 Resultados	75
1.3.1 Filogenia de <i>Austropotamobius italicus</i>	75
1.3.2 Diversidad haplotípica y nucleotídica	77
1.3.3 Análisis filogeográfico de clados anidados	81
1.3.4 Demografía y datación	85

1.4 Discusión	89
1.4.1 Relaciones filogenéticas	89
1.4.2 Diversidad genética	92
1.4.3 Filogeografía y patrones históricos	94
2. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE NUEVOS LOCI MICROSATÉLITES PARA EL CANGREJO DE RÍO EUROPEO <i>AUSTROPOTAMOBIVS ITALICUS</i> (FAXON, 1914)	107
2.1 Resumen	109
2.2 Aislamiento y caracterización	109
3. ESTRUCTURA GENÉTICA DE LAS POBLACIONES DEL CANGREJO DE RÍO <i>AUSTROPOTAMOBIVS ITALICUS</i> (FAXON, 1914) EN ESPAÑA, BASADA EN LA VARIABILIDAD DE LOCI MICROSATÉLITES	119
3.1 Introducción	121
3.2 Métodos	124
3.2.1 Colección de datos	124
3.2.2 Análisis de microsatélites	125
3.2.3 Análisis estadístico	125
3.2.3.1 Determinación del genotipo y de la diversidad genética entre loci	125
3.2.3.2 Diferenciación de las poblaciones	127
3.2.3.3 Estructura genética y flujo	128
3.3 Resultados	131
3.3.1 Diversidad genética entre las poblaciones	131
3.3.2 Número de poblaciones y asignación de los individuos	133
3.3.3 Diferenciación genética	135
3.4 Discusión	140
4. FILOGENIA Y PATRONES EVOLUTIVOS EN LA SUBFAMILIA DE CANGREJOS DE RÍO CAMBARELLINAE (DECAPODA, CAMBARIDAE)	151
4.1 Introducción	153
4.2 Métodos	158
4.2.1 Muestreo y secuenciación	158
4.2.2 Análisis filogenéticos	163
4.2.3 Datación de las divergencias	166
4.2.4 Patrones de diversificación en la subfamilia	167
4.3 Resultados	170
4.3.1 Filogenia	170
4.3.2 Patrones de diversificación y datación	176
4.4 Discusión	180
4.4.1 Relaciones filogenéticas	180
4.4.2 Biogeografía y patrones cladogenéticos	185
5. MARCADORES MICROSATÉLITES PARA EL CANGREJO DE RÍO ENANO, <i>CAMBARELLUS CHAPALANUS</i> FAXON, 1898 (DECAPODA, CAMBARIDAE) DEL CENTRO DE MÉXICO	203
5.1 Resumen	205
5.2 Aislamiento y caracterización	205
6. EVALUACIÓN DEL FLUJO GENÉTICO ENTRE DOS CANGREJOS DE RÍO CON MORFOLOGÍAS DIVERGENTES EN EL LAGO CHAPALA, CENTRO DE MÉXICO	213
6.1 Introducción	215

6.1.1 Especiación y cladogénesis	215
6.1.2 El estudio de la divergencia entre <i>Cambarellus chapalanus</i> y <i>Cambarellus prolixus</i>	217
6.1.3 Escenarios propuestos	219
6.2 Métodos	221
6.2.1 Filogeografía y demografía	221
6.2.1.1 Muestreo y obtención de datos	221
6.2.1.2 Análisis estadísticos	225
6.2.2 Genética de poblaciones inferida a través de marcadores nucleares	227
6.2.2.1 Muestreo	227
6.2.2.2 Loci microsatélites	228
6.2.2.3 Diversidad genética	229
6.2.2.4 Diferenciación de las poblaciones y flujo genético	230
6.2 Resultados	234
6.3 Discusión	245
III. DISCUSIÓN GENERAL	259
III.1 El estudio de la diversidad y la especiación a diferentes escalas evolutivas	261
III.2 Patrones de evolución	263
III.2.1 Patrones microevolutivos	263
III.2.1.1 Variación mitocondrial, filogeografía y genética de poblaciones	263
III.2.1.2 Procesos de diferenciación: importancia de la deriva y el flujo genético	265
III.2.2 Patrones macroevolutivos	270
CONCLUSIONES	279
CONCLUSIONS	283

.....

RESUMEN

RESUMEN

Esta tesis tiene por objetivo inferir los patrones evolutivos que han caracterizado dos grupos de cangrejos de río, el cangrejo de río *Austropotamobius italicus* en Europa mediterránea y la subfamilia de cangrejos enanos Cambarellinae, de Norteamérica. Los patrones inferidos se estudiaron a diferentes escalas temporales, incluyendo aspectos filogenéticos, filogeográficos y de genética de poblaciones. El estudio de estos patrones y los procesos subyacentes constituyen una herramienta elemental para el entendimiento de los factores a los que han respondido y la influencia de cada uno, aportando herramientas útiles para la conservación y manejo de estos grupos, o para el conocimiento de la historia evolutiva de un grupo.

El estudio de la variación y la variabilidad genética de cangrejos de río no ha sido por muchos estudios hasta ahora, sin embargo observaciones previas han documentado la importancia de las variaciones climáticas y geográficas sobre la estructura de las poblaciones, así como patrones de alto flujo genético entre las poblaciones de una misma unidad geográfica, que podrían ser consecuencia de una gran capacidad de dispersión y migración, así como de grandes tamaños poblacionales. Éstas han sido también algunas de las posibles condicionantes para llevar a cabo estudios de genética de poblaciones, ya que algunos estudios han estado limitados por un muestreo insuficiente tanto de poblaciones como de variabilidad genética adecuada para inferir los procesos de las poblaciones. Los estudios filogenéticos son también escasos, y las herramientas moleculares han sido aplicadas sobre todo a intentar resolver preguntas a

altos niveles taxonómicos, como la monofilia de Astacoidea, o las relaciones entre las familias. Sin embargo, no se ha tenido el mismo resultado con las relaciones a niveles taxonómicos menores, como las relaciones entre géneros, mismas que no han sido esclarecidas, lo que ha sido atribuido a la carencia de muestreos taxonómicos completos y a la naturaleza homoplásica de buena parte de los caracteres apomórficos de los distintos géneros. Otras razones podrían encontrarse en una escasa señal filogenética encontrada en marcadores moleculares que en otros organismos suelen ser de utilidad (como algunos fragmentos mitocondriales) y una alta presencia de pseudogenes, que frecuentemente resultan en inferencias erróneas. Considerando los problemas antes aludidos, este trabajo doctoral ha puesto énfasis en un muestreo extenso tanto de las poblaciones como de la variación genética y de los caracteres moleculares informativos, en la inclusión de métodos de inferencia robustos y en adición a los de caracterización molecular clásicos. Lo anterior ha permitido la inferencia de patrones de diversificación y demográficos de ambos grupos a diferentes escalas temporales, así como los factores históricos y recientes que les han dado forma.

Los dos grupos incluidos en esta tesis son grupos de cangrejo de río de características contrastantes, al ser representativos de condiciones ecológicas distintas y a los que los fenómenos geográficos y climáticos han afectado de manera distinta. Por un lado, el cangrejo de río europeo se caracteriza por una historia evolutiva altamente determinada por la variación climática reciente. La diversidad encontrada hoy en día en el género es mucho menor que la encontrada la contraparte norteamericana, y la variabilidad entre las poblaciones corresponde a fuertes variaciones demográficas en la historia más o menos reciente, de hace unos pocos miles de años y ha sido trascendente en las poblaciones de la Península Ibérica sobre todo en el Pleistoceno, cuando un

evento de expansión ha dado origen a la mayoría de las poblaciones actuales. Diferentes eventos históricos han moldeado a los cangrejos enanos, que presentan diferentes periodos de diversificación, posiblemente relacionados tanto con eventos climáticos como geográficos. La variación observada actualmente es mayor, posiblemente como resultado del patrón de alta extinción en el continente europeo, derivado de los periodos glaciales recientes.

Los patrones microevolutivos del cangrejo de río europeo en España inferido a través de marcadores nucleares microsatélites, identifican la importancia que tienen los movimientos llevados a cabo por el hombre en la diversidad genética de una especie. Primeramente, drásticos y recientes cuellos de botella han sido registrados en esta tesis para la mayoría de las poblaciones analizadas, como resultado de un fuerte proceso de deriva hacia el interior de cada población, que ha provocado la fijación de diferentes frecuencias alélicas. Lo anterior podría reflejar la dramática reducción de las poblaciones en España del cangrejo de río autóctono, y los patrones de flujo genético observados, mismos que permiten las inferencias de dispersión a larga distancia, podrían reflejar los esfuerzos de conservación hechos para mantener o refundar algunas de sus poblaciones. Este estudio es un ejemplo de la influencia que las repoblaciones y otras prácticas de conservación pueden tener sobre las especies.

En el caso de los cangrejos de río enanos, los patrones microevolutivos inferidos se encaminaron a evaluar la importancia que tiene la hipótesis de divergencia adaptativa en la diversificación del grupo. Dado que las inferencias cladogenéticas habían mostrado que el patrón de cladogénesis en alopatria (causado por vicarianzas o barreras geográficas), era el más generalizado en la subfamilia, la existencia de un par de

especies hermanas en simpatría significaba una excepción. Este patrón se suele identificar con un contacto secundario o con divergencia adaptativa, es decir aquella mediada por diferencias de tipo ecológico entre dos grupos de poblaciones, que eventualmente evolucionan aislamiento reproductivo. Para definir si se trataba de uno u otro proceso, se infirió el nivel de flujo genético entre las especies *Cambarellus prolixus* y *Cs. chapalanus*, cohabitantes de la cuenca de Chapala, centro de México, estando la primera restringida a las condiciones de más de 4m de profundidad en el lago Chapala. Esta última condición, aunada con la evaluación del flujo genético entre las poblaciones de ambientes contrastantes, permitió identificar un cierto grado de diferenciación de la población de mayor profundidad en el lago, mientras el resto presentaban diferentes grados de mezcla. Lo anterior puede ser originado por un proceso de divergencia adaptativa, al tratarse de la única especie limitada a cierta profundidad del grupo, por lo que la adaptación es una condición necesaria a su definición, y la diferenciación genética se explicaría por este proceso. Un proceso de este tipo ha sido documentado en otras especies de crustáceos, pero es la primera vez que se hace referencia en cangrejos de río.

En esta tesis la integración de diferentes tipos de herramientas moleculares se integra para inferir diferentes patrones evolutivos y han sido útiles para identificar diferencias y semejanzas en distintos grupos de cangrejos de río, y representan una parte clave para la posterior aplicación en áreas como la biología de la conservación y la gestión de poblaciones, así como el estudio biogeográfico y de la adaptación.

.....

ABSTRACT

ABSTRACT

This thesis aims to infer the evolutionary patterns that have characterized two groups of freshwater crayfish *Austropotamobius italicus* in Mediterranean Europe and the subfamily of dwarf crayfish Cambarellinae of North America. Inferred patterns were studied at different scales, including phylogenetic, phylogeographic and population genetics approaches. The study of these patterns and the underlying processes are a basic tool for understanding the factors to which have responded and its importance, providing useful tools for conservation and management of these groups, and the knowledge of history evolutionary group.

The study of variation and the genetic variability of crayfish has not been addressed by many studies to date, however previous observations have documented the importance of climatic and geographical variations on the structure of populations and patterns of high gene flow among populations of a single geographical unit, which could be the result of a great capacity for dispersal and migration, as well as large population sizes. They have also been some of the possible drawbacks to carry out studies of population genetics, as some have been limited by insufficient sampling of both populations and adequate genetic variability to infer population processes. Phylogenetic studies are also scarce, and the molecular tools have been mainly used to resolve questions of higher taxonomic levels such as the monophyly of Astacoidea and the relationship between crayfish families. However, there has not been the same result with lower taxonomic level relationships, such as genera relationships, which have not been clarified, attributed to the lack of comprehensive taxonomic sampling and the nature of

homoplastic characters defining genera and species. Other explanations include a lower phylogenetic signal found in the molecular markers than in other organisms (like some mitochondrial fragments like 16S rRNA) and a high presence of pseudogenes, which often result in erroneous inferences. Considering the problems aforementioned, this dissertation has emphasized large samples of both, populations and informative molecular characters, for the accomplishment of robust inference methods in addition to the classical molecular characterization of populations. This has allowed the inference of diversification and demographic patterns of both groups at different time scales, as well as historical and recent factors that have shaped them.

The two groups included in this thesis are crayfish of contrasting characteristics, to be representative of different ecological conditions, in a way that geographic and climatic events have affected them differently. On one hand, the European crayfish is characterized by an evolutionary history largely determined by recent climate change. For example, the genetic diversity found today in the genus *Austropotamobius* is much smaller than that found North American counterparts, and variability among populations corresponds to strong demographic changes in history within a few thousand of years. This has been observed in populations of the Iberian Peninsula, where climatic modification during the Pleistocene can explain most of the genetic variation observed, due to an event of expansion that has given rise to most of the current populations. Various historical events have shaped dwarf crayfish, representing different periods of diversification, mainly related to both climatic and geographic events. The variation observed today in the only genus conforming the subfamily is higher than that observed for *Austropotamobius*, possibly as a result of the higher extinction pattern in the European continent, from the recent glacial periods.

Microevolutionary patterns of European crayfish in Spain inferred by nuclear microsatellite markers, identified the importance of human-mediated movements on the genetic diversity of a species. Firstly, the work coming from this thesis, found evidence of recent drastic bottlenecks for most populations studied, as a result of a strong process of drifting into each stock, which has led to the establishment of different allelic frequencies. This could reflect the dramatic decline in Spanish native crayfish stocks, and observed patterns of gene flow, which allow inferences of long-distance dispersal, and possibly related to the conservation efforts made to maintain or reestablish some of its populations. This study is an example of the influence that some conservation practices may have on the species.

In the case of the dwarf crayfish subfamily, microevolutionary patterns inferred headed to assess the importance of the hypothesis of adaptive divergence in the diversification of the group. Since cladogenetic inferences showed that the pattern of cladogenesis in allopatry, was the most widespread in the subfamily (caused by vicariance or geographical barriers), the existence of a pair of sister species in sympatry meant an exception. This pattern is usually identified with a secondary contact or adaptive divergence, i.e., that mediated by ecological differences between two groups of populations, which eventually evolve reproductive isolation. To define whether it was one or other process, we infer the level of gene flow between the species *Cambarellus prolixus* and *Cs. chapalanus*, cohabitants of the Chapala Basin, central Mexico, the former being restricted to the conditions of more than 4 m depth in Lake Chapala. This last condition, together with the assessment of gene flow between populations in contrasting environments identified a degree of population differentiation of the deepest

population in the lake, while the rest showed varying degrees of mixture. This can be caused by a process of adaptive divergence, being the only species restricted to a certain depth of the group, so that adaptation is a necessary condition to its definition. A process of this type has been documented in other species of crustaceans, but it is the first time referred to in crayfish.

In this thesis, the integration of different types of molecular tools allows the inference of different evolutionary patterns and has been useful to identify similarities and differences between different groups of crayfish, providing a useful key for subsequent application in areas such as conservation biology, population management, biogeography and biology of adaptation.

I. INTRODUCCIÓN



1.1 LOS CANGREJOS DE RÍO: DISTRIBUCIÓN Y DIVERSIDAD.

Los cangrejos de río son un grupo de Decápodos que pertenecen al infraorden Astacidea, el cual incluye tres superfamilias: 1) Astacoidea (los cangrejos de río del hemisferio Norte), 2) Parastacoidea (presentes en el hemisferio Sur) y 3) Nephropoidea, las langostas con quelípedos distribuidas en todas las grandes cuencas oceánicas. De entre estas, los cangrejos de río se encuentran representados en las dos primeras superfamilias, las cuales forman un grupo monofilético (Crandall *et al.*, 2000b) que incluye a cerca de 640 especies reconocidas (Crandall y Buhay, 2008). Dentro de la superfamilia Astacoidea dos son las familias de cangrejos de río, la familia Astacidea presente en Europa y el Oeste de los EEUU y Cambaridae, en el Este de EEUU y en Asia, mientras que la superfamilia Parastacoidea sólo contiene a la familia Parastacidae. Las familias de cangrejos de río tienen una distribución cosmopolita, encontrándose en todos los continentes con excepción de África (aunque presentes en Madagascar) y la Antártida (Figura 1). Dos son los puntos de mayor diversidad de especies: uno en el sureste de los Estados Unidos y otro en el sureste de Australia.

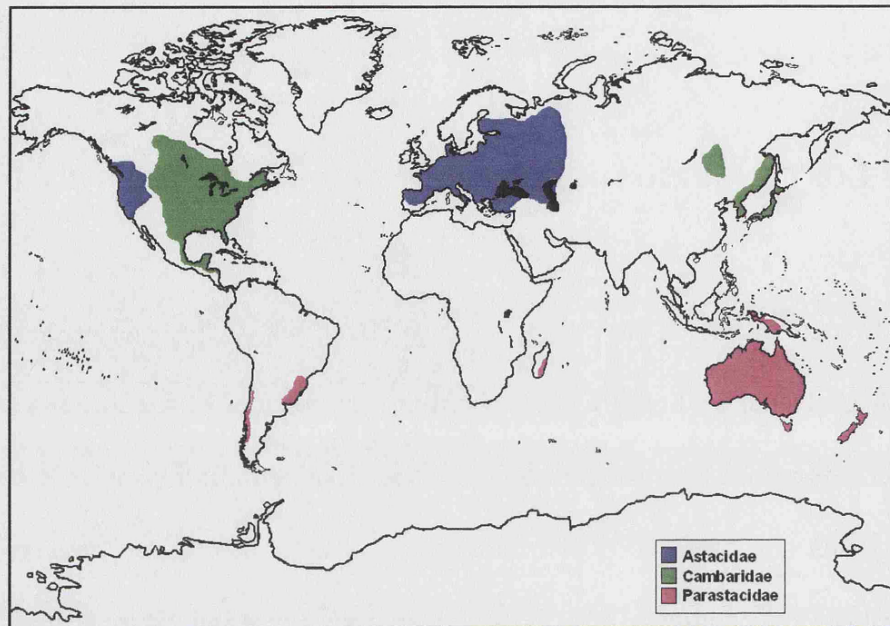


Figura 1. Distribución de los cangrejos de río en el mundo, indicando la distribución de las tres familias que les incluye.

Los cangrejos de río se pueden agrupar en cuatro tipos de acuerdo al uso que hacen del hábitat: excavadores primarios (aquellos que pasan la mayor parte de su vida en galerías), habitantes de arroyos, habitantes de aguas lénticas (incluyendo a excavadores secundarios) y cavernícolas. Especies habitantes de cada tipo de hábitat suelen manifestar adaptaciones similares en diferentes grupos (Figura 2). Por ejemplo, los excavadores primarios suelen poseer quelípedos y un cefalotórax especialmente robustos debido a que tienen grandes cámaras branquiales y estructuras corporales relacionadas con la facilidad de excavar. Los habitantes de arroyos suelen poseer un abdomen grande, relacionado con la eficiencia natatoria y son intolerantes a bajas concentraciones de oxígeno en el agua. Las especies cavernícolas por su parte presentan una serie de especializaciones morfológicas como la pérdida de pigmentación, la reducción o carencia de ojos y unas extremidades corporales y sensoriales alargadas.



Figura 2. Algunas especies de cangrejos de río, mostrando diferentes adaptaciones morfológicas comunes entre especies que ocupan hábitats similares. a) *Procambarus franzi*, una especie cavernícola; b) *Cambarus polychromatus*, una especie especializada en la excavación y la vida subterrestre.

La mayoría de los cangrejos de río tiene una vida de alrededor de dos años, aunque esto es muy variable y se relaciona, como en otros grupos animales, con factores como el tamaño máximo alcanzado, ya que hay especies que pueden vivir más de 20 años (Crandall y Buhay 2008). La reproducción es sexual, aunque hay registros de individuos hermafroditas e incluso partenogénéticos (Scholtz *et al.*, 2003). Generalmente son omnívoros y por lo general de hábitos nocturnos. Existen algunas especies que pueden ser extremadamente destructivas cuando son introducidas. Algunas especies son particularmente invasivas como *Orconectes rusticus* y *Procambarus clarkii* y han sido ampliamente diseminadas con fines económicos. Estas especies han significado una auténtica catástrofe en muchos de los ecosistemas en los que han sido introducidos, pero la gran mayoría de los cangrejos de río tienen distribuciones extremadamente limitadas y se piensa que están bajo algún tipo de amenaza como consecuencia del deterioro generalizado de sus hábitats.

1. 2 ASPECTOS FILOGENÉTICOS DE LOS CANGREJOS DE RÍO

La hipótesis filogenética más aceptada para el infraorden es que los cangrejos de río son monofiléticos y que su grupo hermano es Nephropoidea (Crandall *et al.*, 2000a). La superfamilia Parastacoidea contiene una familia, Parastacidae, con 15 géneros y 176 especies. Por otra parte, Astacoidea contiene dos familias, Astacidae y Cambaridae. Astacidae contiene tres géneros (*Pacifastacus*, *Astacus* y *Austropotamobius*) (Hobbs, 1974), aunque alternativamente se han propuesto hasta seis agrupaciones genéricas (Starobogatov, 1995) y de 16 a 39 especies. La familia Cambaridae contiene dos subfamilias (Cambarellinae y Cambarinae) que a su vez agrupan a 11 géneros (*Barbicambarus*, *Bouchardina*, *Cambarellus*, *Cambarus*, *Distocambarus*, *Fallicambarus*, *Faxonella*, *Hobbseus*, *Orconectes*, *Procambarus*, *Troglocambarus*) y el género asiático *Cambaroides*, cuya posición filogenética es aún enigmática, al situarse entre ambas familias. Cambaridae tiene un total de 445 especies (Crandall y Buhay 2008).

Las relaciones filogenéticas de los cangrejos de río a niveles taxonómicos altos están, en general, bien entendidas. Las dos superfamilias Parastacoidea y Astacoidea son monofiléticas y forman un grupo hermano (Crandall *et al.*, 2000b; Rode y Babcock, 2003). Dentro de los Astacoidea la familia Cambaridae es parafilética, dado que uno de sus géneros, *Cambaroides*, conforma un linaje basal a Astacidae y al resto de Cambaridae (Braband *et al.*, 2006). Con relación a la familia Astacidae, la taxonomía dentro de los géneros *Astacus* y *Pacifastacus* se basa en la revisión morfológica de Hobbs (1989). La filogenia y taxonomía dentro del género *Austropotamobius* ha sido revisada por Grandjean (2000), Zaccara *et al.* (2004) y Fratini *et al.* (2004), los cuales

proponen dos especies y cuatro subespecies. Sin embargo, la familia Astacidae requiere de un estudio general e integrado para lograr una taxonomía estable.

En cuanto a Parastacoidea, las relaciones filogenéticas entre géneros se han resuelto con marcadores mitocondriales (Crandall *et al.*, 2000a) y de los 15 géneros aceptados hoy en día, 8 han sido corroborados por su monofilia (Horwitz y Adams 2000, Austin 1996, Schull *et al.*, 2005, Hansen y Richardson 2006 y Schultz *et al.*, 2007).

Los problemas a la hora de determinar las relaciones filogenéticas en los cangrejos de río se han vuelto aparentes sobre todo a la hora de establecer las relaciones entre especies. La mayoría de los estudios no ha contado con muestreos lo suficientemente extensos y se han basado en unas pocas especies o poblaciones, debido en parte a la cantidad de taxa que se distribuyen por un amplio territorio. La inclusión de caracteres moleculares en los estudios taxonómicos y filogenéticos han mostrado la existencia de numerosas homoplasias morfológicas, y la alta plasticidad fenotípica que aparece en las poblaciones de una misma especie (Braband *et al.*, 2006, Crandall y Fitzpatrick 1996, Taylor y Hardman 2002). Además, la utilización de caracteres moleculares ha revelado casos de parafilia, en las relaciones filogenéticas previamente establecidas con caracteres morfológicos, el descubrimiento de especies crípticas y la existencia de algunas especies que fueron descritas por caracteres morfológicos y que no son soportadas con caracteres moleculares (Austin 1996, Grandjean *et al.*, 2000, Hansen y Richardson 2006, Crandall *et al.*, 2008). Como resultado, Sinclair *et al.* (2004) propusieron completar una filogenia basada en múltiples genes mitocondriales y nucleares. En general, se piensa que debido a que la homoplasia es común en la historia

evolutiva de muchos grupos de cangrejos de río, sólo a través de una cobertura taxonómica completa se podrá contar con inferencias filogenéticas más fiables.

1. 3 EL ESTUDIO DE LA EVOLUCIÓN A DIFERENTES ESCALAS

Por mucho tiempo se ha debatido sobre si en los procesos evolutivos asociados a grandes clados a una escala temporal de decenas o cientos de millones de años se pueden identificar características diferentes a las explicables por la evolución a nivel poblacional. Este debate es lo que lleva a la diferenciación entre macroevolución, entendida como los procesos a escalas temporales mayores y microevolución, como aquella relacionada con procesos a nivel de poblaciones de una especie. Con el tiempo, la tendencia general ha hecho que el término macroevolución caiga en desuso, sobre todo al haber sido erróneamente adoptada para algunas justificaciones de tipo creacionista. En parte por ello muchos científicos han preferido hacer hincapié en que los procesos macroevolutivos no son más que el resultado de la extensión de los procesos microevolutivos a escalas de tiempo mayores que las de poblaciones.

En esta tesis se abordan aspectos evolutivos de los cangrejos de río a diferentes escalas temporales, considerando ambos conceptos como enfoques de un mismo proceso evolutivo. De esta forma, un objetivo fundamental del estudio evolutivo de un grupo es la identificación e importancia que microevolución y macroevolución han tenido en su historia evolutiva.

1.3.1 Patrones macroevolutivos

El concepto de macroevolución ha cambiado considerablemente desde su proposición. Filipchencko en 1927 (en Burian 1988) propuso el concepto en referencia a que la herencia citoplásmica no mendeliana era responsable de la formación de taxa por encima del nivel de especies (Erwin 2000). Posteriormente, su estudiante Dobzhansky (1937) introduce el término de la siguiente manera: *“there is no way toward an understanding of the mechanisms of macroevolution, which require time on a geological scale, other than through a full comprehension of microevolutionary processes... For this reason, we are compelled, at the present level of knowledge reluctantly to put a sign of equality between the mechanisms of macro- and micro-evolution”*. Dobzhansky deja claro que la asunción de que los procesos macroevolutivos son los mismos que los microevolutivos es una necesidad derivada de las limitaciones del conocimiento que en ese momento se tenía de los mecanismos evolutivos, pero no una condición. Sin embargo, desde entonces mayor atención se ha enfocado en las herramientas experimentales que han demostrado la operación de la selección natural a la escala de poblaciones, pero mucho menos explorado ha sido el campo para la puesta a prueba de hipótesis macroevolutivas, probablemente como resultado de limitaciones metodológicas para su abordaje (Tarver *et al.*, 2010). Sin embargo, una vez considerando la evidencia más abajo expuesta y dado que la errónea utilización del término científico macroevolución no condiciona que sea correcto, en esta tesis se considera válido y se hace referencia al mismo en las ocasiones pertinentes.

Los fenómenos macroevolutivos son más evidentes en el campo paleontológico (Stanley, 1975). Evidencias como la observación de explosiones de diversificación

biológica en ciertos intervalos geológicos han sido bien documentadas y gracias a ellas se han demostrado procesos como las extinciones masivas, el origen de novedades evolutivas y la disparidad en el cambio morfológico y de diversificación cladogenética (Rabosky y McCune, 2010; Young *et al.*), los cuales reflejan mecanismos por encima del nivel de especies. Hipótesis como el equilibrio puntuado (Eldredge y Gould, 1972) se pueden identificar con procesos macroevolutivos. El uso del término macroevolución ha suscitado considerable controversia, sobre todo con respecto a si existen distintos procesos atribuibles a los patrones macroevolutivos (Rabosky y McCune, 2010). La pregunta en cuestión es si los mecanismos microevolutivos brindan una explicación suficiente para los patrones macroevolutivos, o si existen propiedades emergentes en el nivel de especies o superior que requieran hacer referencia a procesos macroevolutivos.

El incremento de los estudios filogenéticos en las últimas décadas ha proveído de un contenido evolutivo inusitado, y ha permitido probar hipótesis macroevolutivas (Figura 3). A partir de ello, diferentes mecanismos han sido documentados en varios grupos para explicar los patrones macroevolutivos: 1) la selección de especies, 2) las fuentes de variación y su relación con las constricciones evolutivas y 3) la disparidad en la tasa cladogenética entre diferentes clados. De esta forma, el estudio de los patrones macroevolutivos mediante la correcta inferencia filogenética es una parte importante del estudio evolutivo de un grupo.

En la figura 3 se puede ver un ejemplo hipotético de selección de especies, un patrón macroevolutivo, a consecuencia de que la selección puede actuar sobre un rasgo a dos distintos niveles. Un rasgo se origina por mutación y es fijado rápidamente en una especie por sus efectos positivos en la supervivencia y reproducción (a). Si

suponemos que este rasgo se relaciona con las tasas de especiación o extinción, entonces se observaría un consecuente incremento (b) o disminución (c) de la frecuencia de este rasgo en el clado, debido a la selección al nivel de especies (d). No hay en esto una relación necesaria entre la adecuación individual y la diversificación en el clado, porque la frecuencia del rasgo dentro del clado puede variar independientemente de la adecuación hacia dentro de las poblaciones. Algunos rasgos emergentes como el tamaño corporal son ejemplos de cómo la selección puede ocurrir al nivel de especies (en este caso determinando el tamaño de la población y su área de distribución) (Cooper *et al.*, 2008; McKinney, 1997).

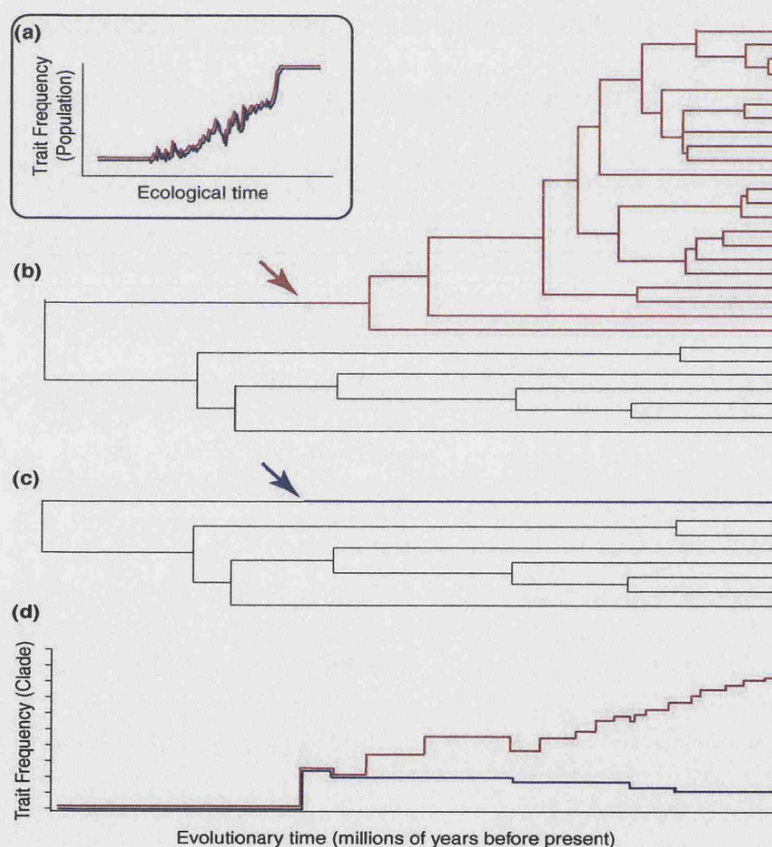


Figura 3. Observación de un proceso macroevolutivo hipotético, en el que se observa el efecto de un rasgo fijado en un grupo (a) y lo que se esperaría si éste ha afectado la diversificación en un grupo positivamente (b), o negativamente (c), lo que finalmente refleja un proceso de selección de las especies (d) que poseen dicho rasgo (figura tomada de (Rabosky y McCune, 2010)).

1.3.2 Patrones microevolutivos

El contexto cuantitativo de la microevolución en la síntesis evolutiva contemporánea se basa en el estudio de la genética de poblaciones (Avice, 2009). Ésta última puede ser definida como el estudio matemático de la dinámica de la variación genética de una especie. Las cuatro mayores fuerzas que influyen en la evolución y la composición genética de las poblaciones son: selección natural, mutación, deriva génica y flujo génico (Wakeley, 2005). El objetivo de la genética de poblaciones es entender la dinámica por la cual las mencionadas fuerzas interactúan para producir y mantener los patrones de variación y variabilidad genética (Wakeley, 2005). Desde un punto de vista genético, la mayoría de las poblaciones muestran algún grado de estructuración debido a los niveles de acción de estas fuerzas y su interacción con barreras ambientales, procesos históricos y su historia natural. El entendimiento del flujo génico, considerado como la migración a nivel génico o la transferencia de alelos de una población a otra (Bossart y Pashley Prowell, 1998), es útil en muchos campos de la investigación biológica. Cuando los genes son intercambiados entre poblaciones, las frecuencias alélicas tienden a ser homogéneas. Una alta tasa de migración evitaría la fijación de alelos y por tanto la diferenciación y en última instancia, la especiación (Mayr, 1954). El flujo génico puede también introducir nuevos alelos en una población, afectando las frecuencias alélicas y evitando también la deriva génica.

La deriva se define como la variación al azar de las frecuencias alélicas debida al muestreo aleatorio de los gametos y otros eventos aleatorios. Debido a que la magnitud

de la deriva es inversamente proporcional al tamaño de una población, en poblaciones grandes se espera un menor efecto de la deriva génica y viceversa (Willi *et al.*, 2007). El efecto de la deriva génica disminuye el conjunto de la variación dentro de una población y provoca, eventualmente, que las poblaciones diverjan y una disminución en la heterocigosidad y pérdida de alelos. Dos ejemplos de la deriva génica son evidentes en los cuellos de botella y el efecto fundador. Un cuello de botella es una reducción súbita del tamaño poblacional, que elimina alelos en una población (Hedrick, 1996; Hey y Harris, 1999). Un efecto fundador es la emergencia de una nueva población a partir de una reducida cantidad de individuos de otra población (Wang y Hey, 1996). Ambos casos se relacionan con una versión reducida de frecuencias alélicas en una población, la cual muestra menos variación que la población original (Luikart *et al.*, 1999; Luikart *et al.*, 1998).

1.3.2.1 Estimación de la diferenciación entre poblaciones y flujo genético

Existen diferentes estrategias que pueden ser usadas para estudiar la variación genética entre poblaciones partiendo de datos tanto de haplotipos como de alelos. Éstos pueden clasificarse como sigue: 1) medidas de estructura poblacional clásicas basadas en los estadísticos de F de Wright (1951), 2) métodos basados en coalescencia para estimar tasas de migración y tamaños efectivos de población (Kingman 2003) y 3) agrupación bayesiana basada en frecuencias alélicas (Corander *et al.* 2003, Hulsenbeck *et al.* 2007, Pritchard *et al.* 2000).

1.3.2.2 *Genética de poblaciones de cangrejos de río*

Los estudios de genética de poblaciones con microsatélites cangrejos de río no son muy numerosos, y se han hecho en su mayoría con un número muy escaso de especies, sobre todo con la finalidad de caracterizar los niveles de variabilidad, flujo genético o estructura en aquellas invasoras y con interés en conservación. Se han aislado loci microsatélites para un total de ocho especies: *Procambarus clarkii* (Belfiore y May, 2000; Zhu y Yue, 2008) *Orconectes placidus* (Walker *et al.*, 2002a), *O. virilis* (Williams *et al.*, 2010), *Procambarus sp.* (especie partenogenética conocida como “Marmokrebs”) (Schulz *et al.*, 2004), *Cherax quadrinatus* (Baker *et al.*, 2000; Xie *et al.*, 2010), *Ch. tenuimanus* (Imgrund *et al.*, 1997), *Astacus astacus* (Kõiv *et al.*, 2009) y *Austropotamobius pallipes* (Gouin *et al.*, 2000). Adicionalmente algunos de estos loci han sido utilizados en dos especies más, *Orconectes limosus* (Hulák *et al.*, 2010; Kohlstrom, 2008) y *Austropotamobius italicus* (Bertocchi *et al.*, 2008). Algunos estudios han tenido por objetivo caracterizar poblaciones invasivas de especies exóticas (Baker *et al.*, 2000; Hulák *et al.*, 2010; Yue *et al.*, 2010a; Yue *et al.*; Yue *et al.*, 2010b; Yue *et al.*, 2008; Zhu y Yue, 2008) la comprobación de reproducción partenogenética (Martin *et al.*, 2007), parentesco y la estructura de poblaciones con finalidades de conservación (Baric *et al.*, 2005; Baric *et al.*, 2006; Bertocchi *et al.*, 2008; Gouin *et al.*, 2006; Kõiv *et al.*, 2009; Walker *et al.*, 2002b; Yue *et al.*, 2010b). La mayoría han reportado niveles adecuados de polimorfismo para la estimación de parámetros de poblaciones, sin embargo sobre todo en los casos de especies amenazadas como *Austropotamobius pallipes*, con poblaciones muy aisladas y de tamaño poblacional reducido, los datos de polimorfismo son bajos.

1.3.2.3 *Filogeografía*

La filogeografía es el estudio de la relación entre la variación genética y la distribución geográfica de una especie o de especies cercanas. Una de las preguntas que busca resolver este campo es la determinación de los efectos que la distancia y las barreras geográficas puedan tener sobre el flujo génico, lo cual puede asociarse a eventos biogeográficos, migraciones u otros factores (Avise *et al.*, 1987; Knowles, 2009). Los organismos que habitan en sistemas de agua dulce ofrecen una oportunidad para estudiar los patrones de flujo génico debido a que suelen estar separados siguiendo las características geográficas. Organismos como los cangrejos de río poseen limitaciones a la dispersión por ambientes diferentes de los acuáticos, por lo que se espera que su distribución refleje patrones relacionados con la historia geográfica de las cuencas hidrológicas y que las distancias fluviales sean más adecuadas para elucidar la biogeografía de las poblaciones (Fetzner Jr y Crandall, 2003). Todos estos factores biológicos y geográficos pueden resultar en la subdivisión de las poblaciones, debido a su aislamiento en diferentes grados (Avise, 2000). Esto a su vez resulta en el incremento o disminución de la probabilidad de reproducción entre individuos de una misma población con respecto a otra. Esta limitación al flujo génico, en conjunción con la acumulación de mutaciones, resulta en la divergencia genética entre poblaciones (Hewitt, 2001). Las diferencias en las tasas de divergencia entre taxa se suelen atribuir a diferencias en su historia natural, mecanismos de dispersión y migración (Ricklefs, 2007).

Estructuración geográfica se ha observado en distintos grupos de cangrejos de río encontrando diferenciación entre las cuencas hidrológicas, a consecuencia de los

eventos glaciales del pleistoceno (Fetzner Jr y Crandall, 2003). En estos estudios también se han encontrado patrones de uniformidad haplotípica hacia dentro de cada cuenca hidrológica, donde lo común es encontrar un solo haplotipo en las poblaciones, lo que sugiere que en estas especies, la dispersión entre cuencas es más bien un evento raro. Casos contrarios a este patrón han sido atribuidos a capturas de ríos (BurrIDGE *et al.* 2007). Evidencias de una gran conectividad se han encontrado en especies cavernícolas, lo que se ha atribuido a una diferente configuración de los sistemas hidrológicos subterráneos (Buhay y Crandall, 2005).

1.4 MARCADORES MOLECULARES

Existe gran variedad de técnicas moleculares y marcadores que han sido usados para resolver preguntas específicas con diferentes ventajas y limitaciones. En general existen aquellos de carácter dominante y codominante. Entre los marcadores dominantes, por ejemplo, se encuentran los DNAs polimórficos amplificados al azar (RAPDs por sus siglas en inglés) y los polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados (RFLPs). Estos marcadores permiten el análisis de múltiples loci y una diferenciación directa entre homocigotos y heterocigotos, pudiendo estimar así parámetros como la heterocigosidad esperada asumiendo el equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE), pero no la heterocigosidad observada. Algunos de los primeros estudios con marcadores moleculares en cangrejos de río utilizaron estos marcadores (Souty-Grosset *et al.*, 1997). Existen algunos estudios en cangrejos de río llevados a cabo utilizando RFLPs del ADN mitocondrial, todos en especies europeas (Grandjean *et al.*, 1998; Grandjean y Souty-Grosset, 1997, 2000b). En uno de los primeros estudios con cangrejos de río (Grandjean *et al.*, 1998), se examinaron 28 poblaciones de

Austropotmobius pallipes provenientes de Francia y Gran Bretaña. Sus resultados sugieren que las poblaciones de Francia están estructuradas en dos grupos, uno distribuido en el norte y otro al sur, y que el grupo del sur era el más diverso. Los marcadores RAPDs fueron utilizados para examinar 13 poblaciones de *Austropotamobius pallipes* de distintas partes de Europa, encontrando niveles significativos de variabilidad entre poblaciones ($H_O = 0.118$). Con base en lo anterior se definieron dos grupos de poblaciones (Grandjean y Souty-Grosset, 2000b), correspondientes al norte y sur de Francia, confirmando los estudios previos con RFLPs.

1.4.1 ADN mitocondrial

Los genomas mitocondriales son haploides y no recombinantes, lo que les hace muy útiles para reconstruir la historia genealógica reciente (Avise, 2000). La herencia del ADN mitocondrial es un cuarto la del ADN nuclear (Moore, 1995), lo que lo hace especialmente susceptible a fluctuaciones estocásticas y útiles en la determinación de eventos al nivel de poblaciones (Avise, 2000).

1.4.2 Microsatélites

Los marcadores codominantes, como las aloenzimas y microsatélites, analizan un locus a la vez y permiten la detección tanto de homocigotos como de heterocigotos (Goldstein y Pollock, 1997). Gracias a esto, a diferencia de los marcadores dominantes, permiten probar si las poblaciones se encuentran en HWE. Desde su descripción su utilización es cada vez más extendida como marcadores moleculares (Litt y Luty 1989,

Tautz 1989) sobre todo a la hora de detectar patrones de estructuración, aunque en cangrejos de río no han sido muy utilizados, posiblemente a consecuencia de que pocos loci se han aislado sólo para unas pocas especies (Kõiv *et al.*, 2009). Los microsatélites son repeticiones en tándem formadas por una a seis bases nitrogenadas (Selkoe 2006). Por lo general se asume que se heredan bajo un patrón mendeliano y que son de naturaleza neutral, por lo tanto no producen un efecto medible en el fenotipo porque se asume que están localizados en regiones no codificantes, sin embargo, puede que se encuentren también ligados a estas regiones (Schlötterer y Tautz 1992). El genotipado de multilocus por medio de la detección por fluorescencia y de técnicas de multiplex (O'Reilly *et al.*, 1996) han simplificado la inclusión de grandes cantidades de muestras simultáneamente, lo que es necesario para lograr inferencias robustas de la variabilidad poblacional (Leberg, 2002).

Una de las principales características de los microsatélites es que tienen una alta tasa de mutación (del orden de $10^{-5} - 10^{-2}$ mutaciones por generación) (Schlötterer, 2000; Weber y May, 1989). Estas mutaciones alteran la longitud de los loci a través de la adición de unidades de repetición, lo que hace a los microsatélites altamente polimórficos en poblaciones naturales, con un promedio de heterocigosidad por arriba del 50% (Di Rienzo *et al.*, 1994a).

Se han descrito al menos dos mecanismos por los cuales los microsatélites adquieren o pierden unidades, que si bien no están bien entendidos, es importante tener claro a qué mecanismo corresponden los datos analizados a la hora de llevar a cabo las inferencias de genética de poblaciones. El primero es llamado “disminución en la replicación del ADN” (Ellegren, 2000) y consiste en un patrón complejo de mutación

que aún no es bien entendido y el segundo por el cual los microsatélites evolucionan es la “recombinación inequitativa”, la cual tiene lugar durante la meiosis. Este último es más adecuado para explicar grandes cambios en los tamaños de los alelos de un loci, pero en general está bastante poco desarrollado (Voet *et al.*, 2006).

Diferentes modelos evolutivos han sido descritos para estudiar la evolución de los microsatélites. El primero es el modelo de alelos infinitos (IAM, por sus siglas en inglés), el cual establece que cada nueva mutación crea un alelo nuevo a cierta tasa y que aquellos alelos que son idénticos en estado indican identidad por descendencia porque han podido originarse sólo una vez (Crow y Kimura, 1970). El segundo es el modelo de mutación por pasos (SMM) (Michalakis y Excoffier, 1996) y es el más ampliamente aplicado en los análisis de la variación en el tamaño de los microsatélites, al asumir que cada mutación crea un nuevo alelo (u) al adicionar o disminuir una sola repetición, con una probabilidad de $u/2$ en ambas direcciones. En consecuencia, entre mayores sean las diferencias de tamaño entre dos diferentes alelos menos relación tendrán entre ellos (Balloux y Goudet 2002). Una variante de este modelo es el modelo en dos fases (TPM) (Di Rienzo *et al.*, 1994b) en el que las mutaciones incrementan o disminuyen el tamaño de los alelos en una unidad con una probabilidad p , mientras que incrementan o disminuyen el tamaño en k repeticiones con una probabilidad de $1-p$. El modelo de K-alelos (Crow y Kimura, 1970), que postula k posibles alelos en una población con una probabilidad de mutar igual a $u/(k-1)$ en cualquiera de los otros $k-1$ estados alélicas. Por último, el modelo de mutación Brawniano (Beerli y Felsenstein, 2001), que es una aproximación del SMM pero que resulta poco adecuado en situaciones de bajo polimorfismo.

1.5 FILOGENIA Y SISTEMÁTICA CON MARCADORES MOLECULARES

La morfología ha sido la herramienta principal a la hora de detectar y describir nuevos taxa de cangrejos de río (Hobbs, 1989), y ha sido usada para interpretar la historia evolutiva de diferentes grupos (Roek, 1972). La aplicación de herramientas moleculares en los últimos años a la sistemática ha mostrado que muchos de los caracteres morfológicos utilizados son de naturaleza plástica o convergente, al ser afectados por selección (Ihle *et al.*, 2006; Schlötterer, 2002). Por otra parte, los estudios no suelen basarse en un muestreo extensivo, por lo que los niveles de variación entre individuos no se han considerado (Fitzpatrick 1987). Una hipótesis de la sistemática integrativa (Pigliucci, 2003; Will *et al.*, 2005) es que la inclusión de caracteres de diversa índole (genética, morfológica, ecológica, etc.) debería mejorar nuestro entendimiento de las relaciones filogenéticas entre los taxa, e inferir con mayor robustez su historia evolutiva.

La familia Cambaridae se distribuye en Norteamérica, desde el centro de Canadá hasta Guatemala y Cuba (Hobbs, 1989). El centro de diversidad de especies se encuentra en el sureste de las montañas Apalaches, a lo largo de la costa atlántica y del Golfo de México, en Estados Unidos. De acuerdo a la hipótesis de los centros de diversidad como puntos más probables de origen, desde su propuesta por Hobbs (Hobbs

Jr, 1984), la noción generalizada es que esta región corresponde al posible origen del grupo. Este patrón es coherente en cuanto al número de géneros considerados, sin embargo, con el aumento de estudios taxonómicos y del esfuerzo de muestreo en otras zonas se ha observado un correspondiente incremento en la descripción de nuevas especies, lo que hace suponer que el estudio de la diversidad de esta familia puede estar subestimado en las regiones menos estudiadas. Debido a esto y considerando que la monofilia de la familia no ha sido sustentada en distintas ocasiones (Breinholt *et al.*, 2009; Crandall *et al.*, 2000b) y a la ausencia de la mayoría de especies de otras regiones en los análisis filogenéticos, parece probable que la diversidad y a nivel de géneros se encuentre también subestimada. Es por lo anterior que las hipótesis biogeográficas de la familia requieren aún de completar hipótesis filogenéticas con un muestreo más incluyente. Por otra parte, la monofilia de las dos subfamilias, Cambarellinae y Cambarinae, ha sido sustentada (Sinclair *et al.*, 2004).

Las relaciones entre los géneros en la familia están lejos de resolverse (Fetzner Jr y Crandall, 2002). Por otro lado, mientras que un 85% de las especies están agrupadas en tres géneros (*Cambarus*, *Orconectes*, *Procambarus*) y dos tienen una diversidad intermedia (*Cambarellus* y *Fallicambarus* con más de quince especies), los siete géneros restantes cuentan con pocas especies (menos de cinco, tres de ellos monotípicos). Los patrones de alta diversidad genérica con escasa resolución filogenética y alta concentración de la diversificación específica en unos cuantos grupos, pueden estar relacionados con un proceso de diversificación temprana en el grupo seguidos de una alta tasa de extinción (Rabosky y Lovette, 2008). Lo anterior hace suponer que debido al escaso muestreo en otras regiones fuera del sureste de Estados Unidos, es probable que en la medida en que se logren estudios filogenéticos

más completos, la diversidad de géneros pueda verse modificada y con ello las hipótesis biogeográficas que les sustentan (Hobbs Jr, 1984). De esta manera, una revisión sistemática del grupo queda aún pendiente.

A nivel de géneros, a pesar de ser la familia de cangrejos de río en que más estudios de sistemática molecular se han hecho, sólo trabajos con un muestreo taxonómico parcial han sido llevados a cabo en los géneros *Orconectes* y *Cambarus* (Buhay y Crandall, 2005; Fetzner Jr y Crandall, 2003; Taylor y Hardman, 2002), mientras que el resto de géneros se encuentran subrepresentados y aún hace falta una hipótesis filogenética incluyente. La monofilia de la mayoría de los géneros no ha sido confirmada, por lo contrario, la evidencia molecular indica que aquellos más diversos son polifiléticos (Sinclair *et al.*, 2004).

1.6 GRUPOS DE ESTUDIO

Los patrones evolutivos en cangrejos de río serán abordados en esta tesis bajo el contexto temporal y espacial antes expuesto considerando los siguientes grupos como modelo: La subfamilia Cambarellinae (familia Cambaridae) y la especie *Austropotamobius italicus* (familia Astacidae).

I.6.1 La subfamilia Cambarellinae

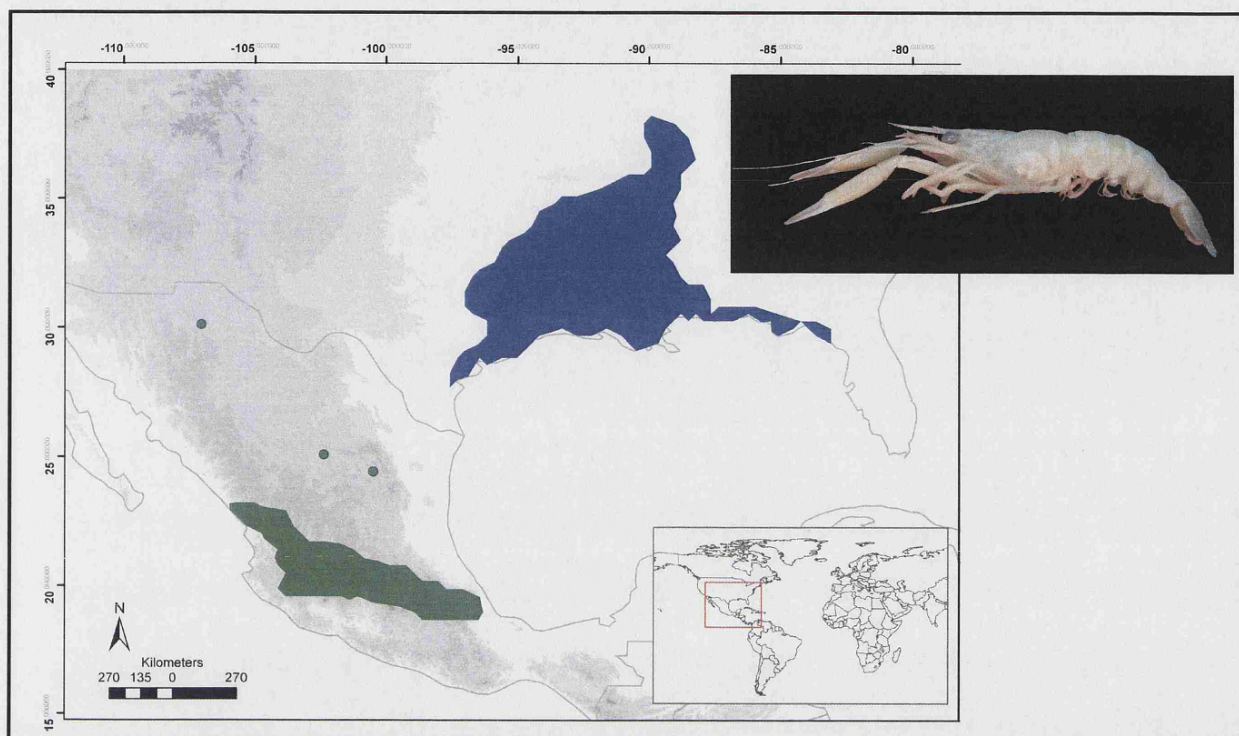


Figura 4. Distribución de la subfamilia de cangrejos de río Cambarellinae. En azul, el componente geográfico del norte y en verde el del sur de la distribución. Se muestran también las tres localidades del norte de la Mesa Central de México correspondientes a tres especies distintas. En la imagen *Cambarellus prolixus*, del centro de México.

La subfamilia Cambarellinae agrupa a los llamados cangrejos de río enanos, y está compuesta por el género *Cambarellus* (Figura 4). Su monofilia ha sido inferida con caracteres moleculares y morfológicos (Sinclair *et al.*, 2004). Su distribución cubre varias cuencas a lo largo del Golfo de México en Estados Unidos y en la Mesa Central de México, sobre todo a lo largo del Cinturón Volcánico Transversal (CVT), en el centro de México. Entre ambos intervalos de distribución se encuentran tres especies, en el norte de la Mesa Central de México, pero hoy en día se consideran extintas (Contreras-Balderas y Lozano-Vilano, 1996). Con 17 especies en total (9 en México y 8 en EEUU), es uno de los géneros con una riqueza de especies intermedia (Crandall y Buhay, 2008). Algunas preguntas relativas a la sistemática, que ha sido abordada con

caracteres morfológicos, biogeografía, definida por un patrón de distribución poco común, y patrones de diversificación son parte de los objetivos de esta tesis. La mayoría de las especies se encuentran en alopatría, con excepción de tres de ellas, de amplia distribución. Todas estas características hacen que el estudio de su historia evolutiva pueda aportar valiosas evidencias en cuanto a la biogeografía y los patrones de diversificación de la familia Cambaridae.

I.6.2 El cangrejo de río europeo *Austropotamobius italicus*.

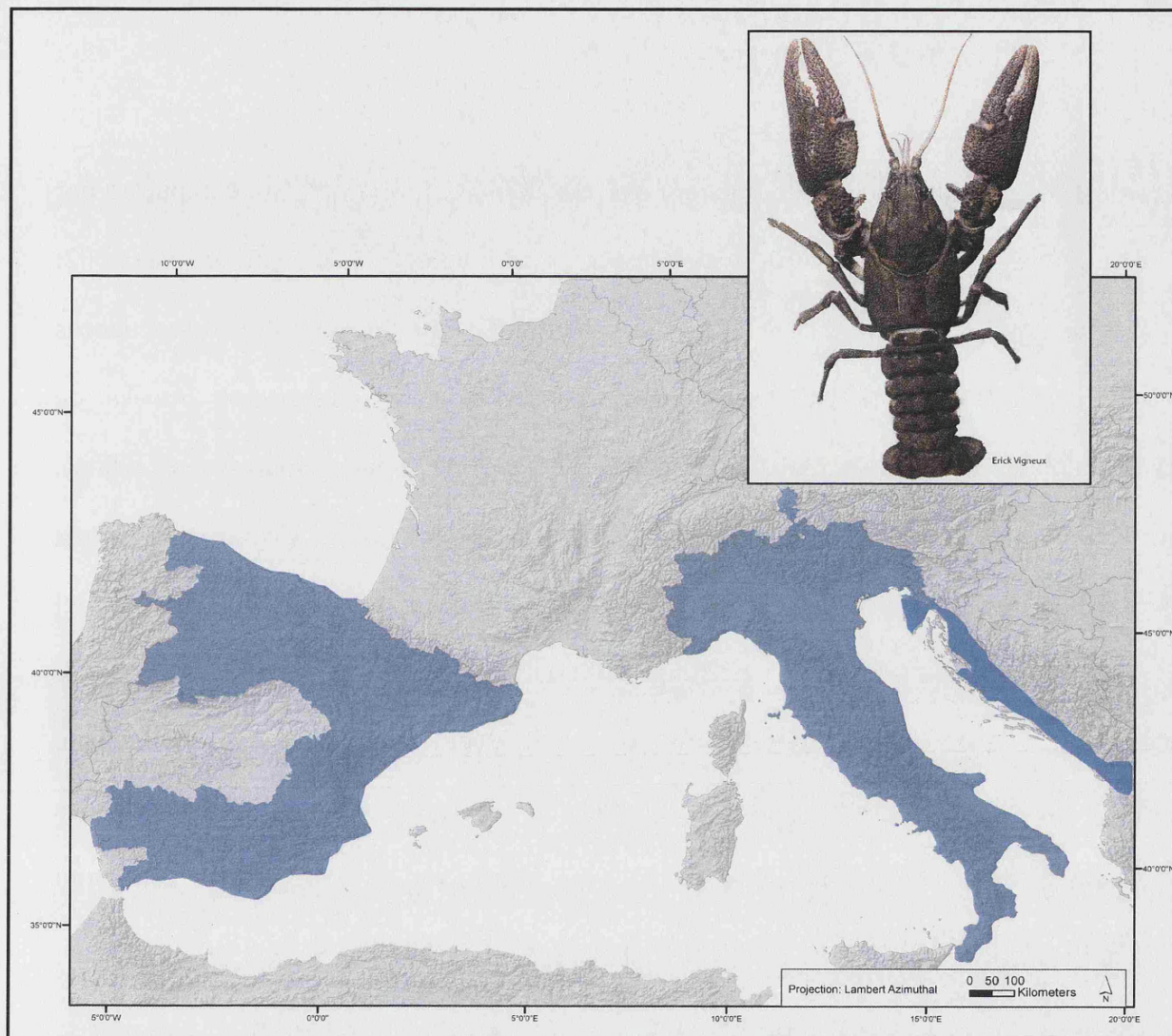


Figura 5. Mapa de distribución del cangrejo de río europeo *Austropotamobius italicus*. Cuatro subespecies son aceptadas actualmente, distribuidas desde algunas cuencas de los Alpes Dináricos hasta la Península Ibérica. La distribución se indica de acuerdo a su presencia en cuencas hidrológicas, la distribución real actualmente se limita a algunas cabeceras de río de cada cuenca.

El cangrejo de río europeo está constituido por las especies del complejo de *A. pallipes* s. lato (Lereboullet, 1858), una especie ampliamente distribuida en la Europa continental, desde los Alpes Dináricos hasta la Península Ibérica y las Islas Británicas (Grandjean y Souty-Grosset, 2000a)). Esta especie presenta una alta heterogeneidad

genética y morfológica, por lo que es un ejemplo interesante para el estudio de los efectos relativos de los cambios climáticos del Pleistoceno y refugios glaciales en la diferenciación genética (Santucci *et al.*, 1997).

Los estudios genéticos sugieren que el complejo *A. pallipes* está compuesto por dos linajes, correspondientes a dos especies diferentes (Grandjean *et al.*, 2002; Grandjean *et al.*, 2000), estando *A. pallipes* distribuida en la mayor parte de las cuencas de Francia, el Rin y el Ródano, algunas cuencas de Suiza, el extremo suroeste de Alemania, y las Islas Británicas (Grandjean *et al.*, 2002; Souty-Grosset *et al.*, 2006), mientras que *Austropotamobius italicus* (Faxon, 1914) (Figura 5), está asociada a una distribución meridional de Europa y se puede encontrar en Italia, las cuencas del Adriático, en Dalmacia y en la Península Ibérica (ver Figura 4) (Fratini *et al.*, 2005; Grandjean *et al.*, 2000; Souty-Grosset *et al.*, 2006). Debido a que es la más ampliamente aceptada, la anterior será la hipótesis taxonómica utilizada en este estudio. Algunas preguntas relacionadas con los patrones demográficos históricos, y la estructura genética de la subespecie *A. i. italicus*, son parte de los objetivos de esta tesis.

REFERENCIAS

- Avice, J., 2009. Phylogeography: Retrospect y prospect. *J. Biogeogr.* 36, 3-15.
- Avice, J., Arnold, J., Ball, R., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J., Reeb, C., Saunders, N., 1987. Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics y systematics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 18, 489-522.
- Avice, J.C., 2000. Phylogeography: The history y formation of species. Harvard University Press, Cambridge, MA.
- Baker, N., Byrne, K., Moore, S., Mather, P., 2000. Characterization of microsatellite loci in the redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus*. *Mol. Ecol.* 9, 494-495.
- Baric, S., Höllrigl, A., Füreder, L., Dalla Via, J., 2005. Mitochondrial y microsatellite DNA analyses of *Austropotamobius pallipes* populations in south Tyrol (Italy) y tyrol (austria). *Bull. Fr. Pêche Piscic* 376, 599-612.
- Baric, S., Hollrigl, A., Fureder, L., Petutschnig, J., Dalla Via, J., 2006. First analysis of genetic variability in carinthian populations of the white-clawed crayfish *Austropotamobius pallipes*. *Bull. Fr. Pêche. Piscic.* 380, 977-990.
- Beerli, P., Felsenstein, J., 2001. Maximum likelihood estimation of a migration matrix y effective population sizes in n subpopulations by using a coalescent approach. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 4563.
- Belfiore, N., May, B., 2000. Variable microsatellite loci in red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*, y their characterization in other crayfish taxa. *Mol. Ecol.* 9, 2231-2234.
- Bertocchi, S., Brusconi, S., Gherardi, F., Grandjean, F., Souty-Grosset, C., 2008. Genetic variability of the threatened crayfish *Austropotamobius italicus* in Tuscany (Italy): Implications for its management. *Fundamental and Applied Limnology/Archiv für Hydrobiologie* 173, 153-164.
- Bossart, J., Pashley Prowell, D., 1998. Genetic estimates of population structure y gene flow: Limitations, lessons y new directions. *Trends Ecol. Evol.* 13, 202-206.
- Breinholt, J., Perez-Losada M., Crandall, K.A., 2009. The timing of the diversification of the freshwater crayfishes. In: Martin, J.W., Crandall, K.A., Felder, D.L. (Eds.),

- Decapod crustacean phylogenetics. Taylor y Francis Group, LLC, Boca Raton, FL, pp. 343-356.
- Buhay, J., Crandall, K., 2005. Subterranean phylogeography of freshwater crayfishes shows extensive gene flow y surprisingly large population sizes. *Mol. Ecol.* 14, 4259-4273.
- Contreras-Balderas, S., Lozano-Vilano, M., 1996. Extinction of most Sandia y Potosi valleys (Nuevo Leon, Mexico) endemic pupfishes, crayfishes y snails. *Ichthyological exploration of freshwaters. Munchen* 7, 33-40.
- Cooper, N., Bielby, J., Thomas, G.H., Purvis, A., 2008. Macroecology y extinction risk correlates of frogs. *Global Ecol. Biogeogr.* 17, 211-221.
- Crandall, K., Buhay, J., 2008. Global diversity of crayfish (Astacidae, Cambaridae, y Parastacidae—Decapoda) in freshwater. *Freshwater Animal Diversity Assessment*, 295-301.
- Crandall, K., Fetzner Jr, J., Jara, C., Buckup, L., 2000a. On the phylogenetic positioning of the south american freshwater crayfish genera (Decapoda: Parastacidae). *Journal of Crustacean Biology* 20, 530-540.
- Crandall, K., Harris, D., Fetzner Jr, J., 2000b. The monophyletic origin of freshwater crayfish estimated from nuclear y mitochondrial DNA sequences. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 267, 1679.
- Crow, J., Kimura, M., 1970. An introduction to population genetics theory. *Minneapolis, MN: Burgess Publishing Company*.
- Di Rienzo, A., Peterson, A., Garza, J., Valdes, A., Slatkin, M., Freimer, N., 1994a. Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 3166.
- Di Rienzo, A., Peterson, A.C., Garza, J.C., Valdes, A.M., Slatkin, M., Freimer, N.B., 1994b. Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 3166-3170.
- Eldredge, N., Gould, S., 1972. Punctuated equilibria: An alternative to phyletic gradualism. *Models in paleobiology* 82, 115.
- Faxon, W., 1914. Notes on the crayfishes in the united states national museum y the museum of comparative zoology, with descriptions of new species y subspecies.

- Memoirs of the Museum of Comparative Zoology at Harvard College* 40, 351-427, 313 plates.
- Fetzner Jr, J., Crandall, K., 2003. Linear habitats y the nested clade analysis: An empirical evaluation of geographic versus river distances using an ozark crayfish (Decapoda: Cambaridae). *Evolution* 57, 2101-2118.
- Fetzner Jr, J., Crandall, K.A., 2002. Genetic variation. In: Holdich, D.M. (Ed.), *Biology of freshwater crayfish*. Blackwell Science, Oxford, pp. 291-326.
- Goldstein, D.B., Pollock, D.D., 1997. Launching microsatellites: A review of mutation processes y methods of phylogenetic inference. *Journal of Heredity* 88, 335-342.
- Gouin, N., Grandjean, F., Souty-Grosset, C., 2000. Characterization of microsatellite loci in the endangered freshwater crayfish *Austropotamobius pallipes* (Astacidae) y their potential use in other decapods. *Mol Ecol* 9, 636-638.
- Gouin, N., Grandjean, F., Souty-Grosset, C., 2006. Population genetic structure of the endangered crayfish *Austropotamobius pallipes* in france based on microsatellite variation: Biogeographical inferences y conservation implications. *Freshwat. Biol.* 51, 1369-1387.
- Grandjean, F., Frelond-Raimond, M., Souty-Grosset, C., 2002. Compilation of molecular data for the phylogeny of the genus *austropotamobius*: One species or several? *Bull. Fr. Peche Piscic.* 367, 671-680.
- Grandjean, F., Gouin, N., Frelon, M., Souty-Grosset, C., 1998. Genetic y morphological systematic studies on the crayfish *Austropotamobius pallipes* (decapoda: Astacidae). *Journal of Crustacean Biology* 18, 549-555.
- Grandjean, F., Harris, D.J., Souty-Grosset, C., Crandall, K.A., 2000. Systematics of the european endangered crayfish species *Austropotamobius pallipes* (decapoda: Astacidae). *Journal of Crustacean Biology* 20, 522-529.
- Grandjean, F., Souty-Grosset, C., 1997. Preliminary results on the genetic variability of mitochondrial DNA in the signal crayfish, *Pacifastacus leniusculus* dana. *C R Acad Sci III* 320, 551-556.
- Grandjean, F., Souty-Grosset, C., 2000a. Genetic y morphological variation in the endangered crayfish species, *Austropotamobius pallipes* (lereboullet)(crustacea, astacidae) from the poitou-charentes region (France). *Aquatic Sciences-Research Across Boundaries* 62, 1-19.

- Grandjean, F., Souty-Grosset, C., 2000b. Mitochondrial DNA variation y population genetic structure of the white-clawed crayfish, *Austropotamobius pallipes pallipes*. *Conserv. Genet.* 1, 309-319.
- Hedrick, P.W., 1996. Bottleneck(s) or metapopulation in cheetahs. *Conserv. Biol.* 10, 897-899.
- Hewitt, G., 2001. Speciation, hybrid zones y phylogeography – or seeing genes in space y time. *Mol. Ecol.* 10, 537-549.
- Hey, J., Harris, E., 1999. Population bottlenecks y patterns of human polymorphism. *Mol Biol Evol* 16, 1423-1426.
- Hobbs, H., 1989. An illustrated checklist of the american crayfishes (decapoda, astacidae, cambaridae, parastacidae). *Smithson. Contrib. Zool.* 480, 1-236.
- Hobbs, H.H.J., 1974. A checklist of the north y middle american crayfishes (decapoda: Astacidae y cambaridae). *Smithson. Contrib. Zool.* 166, iii+161, 161-294.
- Hobbs Jr, H., 1984. On the distribution of the crayfish genus *Procambarus* (decapoda: Cambaridae). *Journal of Crustacean Biology* 4, 12-24.
- Hulák, M., Kašpar, V., Kozák, P., Filipová, L., Petrusek, A., 2010. Cross-species amplification of microsatellite markers in the invasive spiny-cheek crayfish (*orconectes limosus*): Assessment y application. *J. Appl. Genet* 51.
- Ihle, S., Ravaoarimanana, I., Thomas, M., Tautz, D., 2006. An analysis of signatures of selective sweeps in natural populations of the house mouse. *Mol. Biol. Evol.* 23, 790.
- Imgrund, J., Groth, D., Wetherall, J., 1997. Genetic analysis of the freshwater crayfish *Cherax tenuimanus*. *Electrophoresis* 18, 1660-1665.
- Knowles, L.L., 2009. Statistical phylogeography. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 40, 593-612.
- Kohlstrom, N., 2008. An investigation of genetic divergence among invasive crayfish (*Orconectes virilis*) populations using microsatellites. Bachelor Thesis. Worchester Polytechnic Institute.
- Kõiv, K., Gross, R., Paaver, T., Hurt, M., Kuehn, R., 2009. Isolation y characterization of 11 novel microsatellite DNA markers in the noble crayfish, *Astacus astacus*. *Anim. Genet.* 40, 124-124.
- Leberg, P., 2002. Estimating allelic richness: Effects of sample size y bottlenecks. *Mol. Ecol.* 11, 2445-2449.
- Lereboullet, A., 1858. Description de deux espèces d'écrevisses de nos rivières. *Mém. Soc. Sci. Nat. Strasbourg* 5, 11p. + 13 pl.

- Luikart, G., Cornuet, J.M., Allendorf, F.W., 1999. Temporal changes in allele frequencies provide estimates of population bottleneck size. *Conserv. Biol.* 13, 523-530.
- Luikart, G., Sherwin, W.B., Steele, B.M., Allendorf, F.W., 1998. Usefulness of molecular markers for detecting population bottlenecks via monitoring genetic change. *Mol. Ecol.* 7, 963-974.
- Martin, P., Kohlmann, K., Scholtz, G., 2007. The parthenogenetic marmorkrebs (marbled crayfish) produces genetically uniform offspring. *Naturwissenschaften* 94, 843-846.
- Mayr, E., 1954. Change of genetic environment y evolution. *Evolution as a Process* 157, 180.
- McKinney, M., 1997. Extinction vulnerability y selectivity: Combining ecological y paleontological views. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 28, 495-516.
- Michalakis, Y., Excoffier, L., 1996. A generic estimation of population subdivision using distances between alleles with special reference for microsatellite loci. *Genetics* 142, 1061.
- Moore, W., 1995. Inferring phylogenies from mtdna variation: Mitochondrial-gene trees versus nuclear-gene trees. *Evolution* 49, 718-726.
- O'Reilly, P., Hamilton, L., McConnell, S., Wright, J., 1996. Rapid analysis of genetic variation in atlantic salmon (*salmo salar*) by pcr multiplexing of dinucleotide y tetranucleotide microsatellites. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 53, 2292-2298.
- Pigliucci, M., 2003. From molecules to phenotypes?-the promise y limits of integrative biology. *Basic Appl. Ecol.* 4, 297-306.
- Rabosky, D., McCune, A., 2010. Reinventing species selection with molecular phylogenies. *Trends Ecol. Evol.* 25, 68-74.
- Rabosky, D.L., Lovette, I.J., 2008. Explosive evolutionary radiations: Decreasing speciation or increasing extinction through time? *Evolution* 62, 1866-1875.
- Ricklefs, R., 2007. Estimating diversification rates from phylogenetic information. *Trends Ecol. Evol.* 22, 601-610.
- Rode, A., Babcock, L., 2003. Phylogeny of fossil y extant freshwater crayfish y some closely related nephropid lobsters. *Journal of Crustacean Biology* 23, 418-435.
- Santucci, F., Iaconelli, M., Andreani, P., 1997. Allozyme diversity of european freshwater crayfish of the genus *austropotamobius*. *Bull. Fr. Peche Piscic.* 347, 663-676.

- Schlötterer, C., 2000. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma* 109, 365-371.
- Schlötterer, C., 2002. Towards a molecular characterization of adaptation in local populations. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12, 683-687.
- Scholtz, G., Braband, A., Tolley, L., Reimann, A., Mittmann, B., Lukhaup, C., Steuerwald, F., Vogt, G., 2003. Ecology: Parthenogenesis in an outsider crayfish. *Nature* 421, 806.
- Schulz, H., mietana, P., Schulz, R., 2004. Assessment of DNA variations of the noble crayfish (*Astacus astacus*) in germany y poland using inter-simple sequence repeats (issrs). *Bull. Fr. Pêche Piscic* 372, 387-399.
- Sinclair, E., Fetzner Jr, J., Buhay, J., Crandall, K., 2004. Proposal to complete a phylogenetic taxonomy y systematic revision for freshwater crayfish (astacida). *Freshwater Crayfish* 14, 21-29.
- Souty-Grosset, C., Grandjean, F., Raimond, R., Frelon, M., Debenest, C., Bramard, M., 1997. Conservation genetics of the white-clawed crayfish *Austropotamobius pallipes*: The usefulness of the mitochondrial DNA marker. *Bull. Fr. Peche Piscic.*, 677-692.
- Souty-Grosset, C., Holdich, D.M., Noël, P.Y., Reynolds, J.D., Haffner, P., 2006. Atlas of crayfish in europe. Museum National dHistoire Naturelle, Paris.
- Starobogatov, Y., 1995. Taxonomy y geographical distribution of crayfishes of asia y east europe (crustacea decapoda astacoidei). *Arthropoda Selecta* 4, 3-25.
- Tarver, J.E., Donoghue, P.C.J., Benton, M.J., 2010. Is evolutionary history repeatedly rewritten in light of new fossil discoveries? *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*.
- Taylor, C.A., Hardman, M., 2002. Phylogenetics of the crayfish subgenus *Crockerinus*, genus *Orconectes* (Decapoda: Cambaridae), based on cytochrome oxidase i. *Journal of Crustacean Biology* 22, 874-881.
- Voet, D., Voet, J., Pratt, C., 2006. Fundamentals of biochemistry: Life at the molecular level. Wiley, Hoboken, NJ.
- Wakeley, J., 2005. The limits of theoretical population genetics. *Genetics* 169, 1.
- Walker, D., Porter, B., Avise, J., 2002a. Genetic parentage assessment in the crayfish *Orconectes placidus*, a high-fecundity invertebrate with extended maternal brood care. *Mol. Ecol.* 11, 2115-2122.

- Walker, D., Porter, B.A., Avise, J.C., 2002b. Genetic parentage assessment in the crayfish *Orconectes placidus*, a high-fecundity invertebrate with extended maternal brood care. *Mol. Ecol.* 11, 2115-2122.
- Wang, R.L., Hey, J., 1996. The speciation history of *Drosophila pseudoobscura* y close relatives: Inferences from DNA sequence variation at the period locus. *Genetics* 144, 1113-1126.
- Weber, J., May, P., 1989. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am. J. Hum. Genet.* 44, 388.
- Will, K., Mishler, B., Wheeler, Q., 2005. The perils of DNA barcoding y the need for integrative taxonomy. *Syst. Biol.* 54, 844.
- Willi, Y., Van Buskirk, J., Schmid, B., Fischer, M., 2007. Genetic isolation of fragmented populations is exacerbated by drift y selection. *J. Evol. Biol.* 20, 534-542.
- Williams, B., Davis, C., Coltman, D., 2010. Isolation y characterization of nine polymorphic microsatellite loci in the northern crayfish (*Orconectes virilis*). *Conservation Genetics Resources*, 1-3.
- Xie, Y., He, L., Sun, J., Chen, L., Zhao, Y., Wang, Y., Wang, Q., 2010. Isolation y characterization of fifteen microsatellite loci from the redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus*. *Aquat. Living Resour.* 23, 231-234.
- Young, N., Wagner, G., Hallgrímsson, B. 2010. Development y the evolvability of human limbs. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 3400.
- Yue, G., Le Li, J., Wang, C., Xia, J., Wang, G., Feng, J., 2010a. High prevalence of multiple paternity in the invasive crayfish species, *Procambarus clarkii*.
- Yue, G., Li, J., Bai, Z., Wang, C., Feng, F., Genetic diversity y population structure of the invasive alien red swamp crayfish. *Biol. Invasions*, 1-10.
- Yue, G., Li, J., Bai, Z., Wang, C., Feng, F., 2010b. Genetic diversity y population structure of the invasive alien red swamp crayfish. *Biol. Invasions* 12, 2697-2706.
- Yue, G., Wang, G., Zhu, B., Wang, C., Zhu, Z., Lo, L., 2008. Discovery of four natural clones in a crayfish species *Procambarus clarkii*. *International Journal of Biological Sciences* 4, 279.
- Zhu, Z., Yue, G., 2008. Eleven polymorphic microsatellites isolated from red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*. *Molecular Ecology Resources* 8, 796-798.

II. OBJETIVOS

.....

II. OBJETIVOS

El objetivo principal de esta tesis es evaluar los patrones de diversificación de los cangrejos de río, considerando como modelo dos grupos de cangrejos que viven en dos regiones biogeográficamente alejadas, pero extraordinariamente complejas como son el Mediterráneo y la Mesa Central de México durante el Cenozoico. Uno de los grupos lo constituye el cangrejo europeo *Austropotamobius italicus* (Faxon 1914) perteneciente a la familia Astacidae y el otro la subfamilia Cambarellinae de Norteamérica, pertenecientes a la familia Cambaridae. Para su estudio se tomarán en cuenta diferentes escalas de diversificación, a partir de datos moleculares, infiriendo los modelos microevolutivos y macroevolutivos involucrados y las fuerzas que probablemente han definido sus patrones variación y variabilidad genética.

Los objetivos específicos son:

- 1) Llevar a cabo una aproximación a la historia evolutiva reciente de las poblaciones de cangrejo de río *Austropotamobius italicus* desde una perspectiva filogeográfica.
- 2) Analizar la variabilidad genética y los patrones de flujo genético entre las poblaciones de *Austropotamobius italicus* en la Península Ibérica a partir de datos nucleares.
- 3) Identificar los patrones de diversificación implicados en la historia evolutiva de la subfamilia de cangrejos de río Cambarellinae, y los patrones biogeográficos asociados.
- 4) Evaluar patrones microevolutivos distintivos entre las especies de la subfamilia, como un ejemplo del estudio de los mecanismos de diversificación en la misma.

.....

Capítulo 1

Estructura mitocondrial de las poblaciones ibéricas del cangrejo de río, *Austropotamobius italicus italicus* (FAXON, 1914).

1.1 INTRODUCCIÓN

Las modificaciones históricas en el clima se consideran como uno de los principales factores que han contribuido a dar forma a la distribución de las especies. De hecho, las modificaciones latitudinales y altitudinales en la distribución de las especies asociadas a tales cambios climáticos han sido propuestos como uno de los factores clave del cambio evolutivo (Hewitt, 2000, 1999, 2004). Sin embargo, la importancia del cambio climático durante el Pleistoceno ($\sim 1,8 \times 10^6$ -10.000 años) como impulsor en la divergencia genética y la especiación sigue siendo controvertido. La participación de estos procesos ha sido sugerida previamente en la diversificación de algunos taxones (por ejemplo, Barraclough y Vogler, 2002; Johnson y Cicerón, 2004; Knowles, 2001; Ribera y Vogler, 2004), mientras que para otros no ha sido observado un efecto significativo (por ejemplo, Kadereit *et al.*, 2004; Klicka y Zink, 1997, 1999). Es probable que el grado en que el clima del Pleistoceno influya en la división de las especies dependa de factores como la historia de vida del organismo, la oportunidad ecológica y la historia geomorfológica regional (Weir, 2006). Por tanto, es razonable esperar que ciertos taxones y / o áreas geográficas puedan ser más propensos a mostrar mayores niveles de diversificación a consecuencia del cambio climático durante Pleistoceno que otros.

El cangrejo de río europeo está constituido por las especies del complejo de *A. pallipes s. lato* (Lereboullet, 1858), una especie ampliamente distribuida en la Europa continental, desde los Alpes Dináricos hasta la Península Ibérica y las Islas Británicas (Grandjean y Souty- Grosset, 2000). Esta especie presenta una alta heterogeneidad

genética y morfológica, por lo que es un ejemplo interesante para el estudio de los efectos relativos de los cambios climáticos del Pleistoceno y refugios glaciales en la diferenciación genética (Santucci *et al.*, 1997). La alta variabilidad intraespecífica que presenta este grupo a través de su área de distribución ha resultado en numerosas revisiones taxonómicas en los últimos cinco años, en un intento de clasificar los grupos morfológica y genéticamente distintos que han podido ser identificados hasta la fecha (Bott, 1950; Karaman, 1963; Starobogatov, 1995). Este problema es bastante complejo debido a que las diferencias morfológicas no han sido asociadas a linajes determinados con éxito. Los estudios genéticos sugieren que el complejo *A. pallipes* está compuesto por dos linajes, correspondientes a dos especies diferentes (Grandjean *et al.* 2002b, 2000), estando *A. pallipes* distribuida en la mayor parte de las cuencas de Francia, el Rin y el Ródano, algunas cuencas de Suiza, el extremo suroeste de Alemania, y las Islas Británicas (Grandjean *et al.*, 2002b; Souty-Grosset *et al.*, 2006), mientras que *Austropotamobius italicus* (Faxon, 1914), está asociada a una distribución meridional de Europa y se puede encontrar en Italia, las cuencas del Adriático, en Dalmacia y en la Península Ibérica (ver Figura 1.) (Fratini *et al.*, 2005; Grandjean *et al.*, 2000; Souty-Grosset *et al.*, 2006). Debido a que es la más ampliamente aceptada, la anterior será la hipótesis taxonómica utilizada en este estudio.

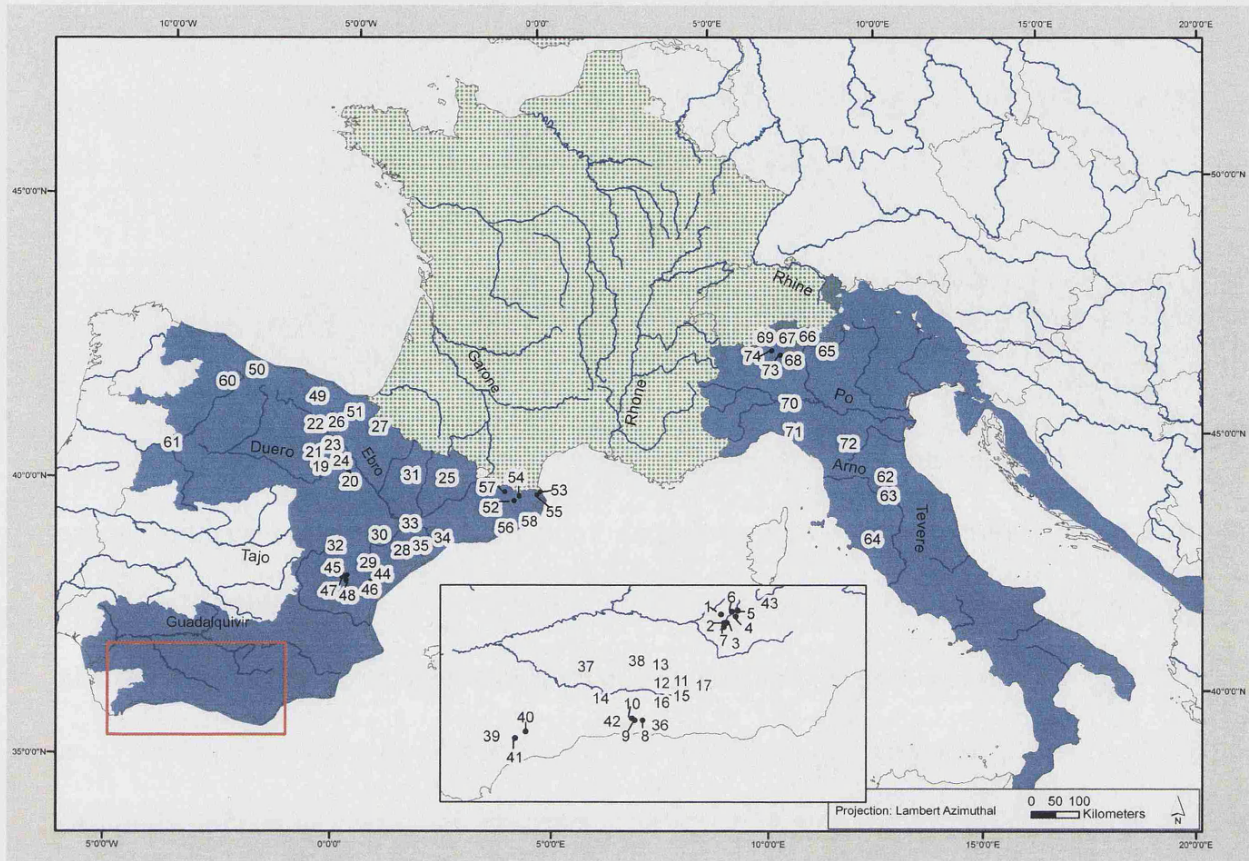


Figura 1. Mapa de localidades incluidas en este estudio. Los números corresponden a las localidades mencionadas en la Tabla 1. Los patrones de fondo indican la distribución aproximada, de al menos de una población en una Cuenca, aunque la distribución real es mucho más restringida; el área sólida corresponde a la distribución de *A. italicus*; el área en cuadros corresponde a la distribución de *A. pallipes* (modificada de Baric, 2005; Grandjean *et al.*, 2002b; Souty-Grosset *et al.*, 2006; Trontelj *et al.*, 2005).

La clasificación subespecífica en la taxonomía de *A. italicus* se basa actualmente en las secuencias del gen 16S ARNr mitocondrial (Grandjean *et al.*, 2002a; Grandjean *et al.*, 2000.) y es soportada parcialmente por datos morfológicos (Bott, 1950; Brodsky, 1983; Grandjean *et al.*, 1998; Karaman, 1962) y de aloenzimas (Santucci *et al.*, 1997). Cuatro subespecies son aceptadas: *A. i. carsicus* Karaman M., 1962 *A. i. carinthiacus* Albrecht, 1981, *A. i. italicus* (Faxon, 1914) y *A. i. meridionalis* (Fratini *et al.*, 2005). La subespecie *A. i. italicus* se encuentra principalmente en los Apeninos centrales en Italia,

en dos localidades en el sur de Francia y España, *A. i. carsicus* se distribuye a través de la Dináricos y los Alpes Orientales, *A. i. carinthiacus* se encuentra en el centro y noroeste de Italia, Austria y Suiza y la subespecie *A. i. meridionalis* se encuentra principalmente en el sur de Italia y Eslovenia (Fratini *et al.*, 2005).

El patrón de distribución desigual y complejo de *A. italicus* sin embargo, no siempre coincide con los intervalos propuestos para sus subespecies, como lo demuestran diferentes estudios moleculares en los que la estructura genética no se corresponde con el origen geográfico de las muestras (Grandjean *et al.* 2000; Trontelj *et al.*, 2005). Los últimos trabajos sugieren que los patrones genéticos identificados hasta la fecha no son capaces de explicar la distribución geográfica de las subespecies y, en consecuencia, no proporcionan un marco adecuado para interpretar la historia evolutiva de esta especie.

La historia de la evolución y el origen de las poblaciones de *A. italicus* en la Península Ibérica son particularmente polémicos. Los primeros estudios moleculares basados en datos de diversidad genética mitocondrial, mostraron valores muy bajos en las poblaciones ibéricas de *A. italicus*, así como haplotipos compartidos y una diferenciación no significativa entre la subespecie ibérica *A. i. lusitanicus* (Bott, 1950) la italiana *A. i. italicus* (Grandjean *et al.*, 2002a; Grandjean *et al.*, 2000; Iaconelli, 2001; Santucci *et al.*, 1997; Trontelj *et al.*, 2005). Estas observaciones llevaron a concluir que las poblaciones ibéricas de cangrejo de río se habían originado por introducción de *A. i. italicus* desde el noroeste de Italia (Grandjean *et al.*, 2002a; Grandjean *et al.*, 2000; Trontelj *et al.*, 2005).

Estudios posteriores sin embargo (Beroiz *et al*, 2008; Dieguez-Urbeondo *et al*, 2008), encontraron una mayor variación genética en la Península Ibérica y al menos dos haplotipos mitocondriales diferentes, además con cierta congruencia geográfica, lo que sugiere que *A. italicus* en la Península Ibérica tuvo un origen autóctono.

El debate por lo tanto sigue abierto, y dado que al parecer están involucrados patrones complejos y recientes son necesarios estudios más exhaustivos y bases de datos robustas para dar explicaciones convincentes de la estructura filogeográfica de las poblaciones ibéricas de *A. italicus* (Schmitt *et al.*, 2006). El objetivo de este capítulo es proponer una hipótesis filogeográfica válida que explique la evolución y el origen de las poblaciones ibéricas de *A. italicus*.

Como resultado del origen natural o mediado por el humano de las poblaciones ibéricas de *A. i. italicus*, dos escenarios diferentes pueden ser propuestos, cada uno dando lugar a características genéticas contrastantes. En primer término, si *A. italicus* se ha introducido recientemente en la Península Ibérica desde Italia, se esperaría que la mayoría de los haplotipos entre *A. i. italicus* de Italia y de la Península Ibérica fueran compartidos, así como una menor diversidad de nucleótidos en el segundo, debido a un efecto fundador correspondiente. Sin embargo, si *A. italicus* fuera una especie autóctona de la Península Ibérica, se esperaría una cierta concordancia entre la geografía y la estructura genética a consecuencia del grado de aislamiento, que podría existir entre las regiones geográficas debido al tiempo transcurrido desde la separación de las poblaciones, incluso si son de tiempos muy recientes. Además, se esperaría obtener estimaciones de divergencia mayores entre poblaciones ibéricas e italianas en el último escenario.

Para probar estas hipótesis, se colectaron los datos de distribución y moleculares más amplios para poblaciones de *A. italicus* en la Península Ibérica hasta la fecha. Estos datos se compararon con secuencias homólogas de ADN disponibles anteriormente y fueron analizados a nivel filogenético y de poblaciones.

1.2 MÉTODOS

1.2.1 Colección de tejidos y de datos

Doscientos cuatro individuos de *A. italicus* provenientes de 53 poblaciones diferentes fueron colectados comprendiendo la mayor parte de su intervalo de distribución en la Península Ibérica (Figura 1). Por otra parte, fueron secuenciados 19 individuos de tres poblaciones italianas atribuidos a tres subespecies diferentes: *A. i. italicus*, *A. i. carinthiacus* y *A. i. carsicus* y fueron también incluidos en este estudio (Tabla 1). Inicialmente las muestras de la Península Ibérica fueron asignados a *A. i. italicus* de acuerdo a Grandjean *et al.*, (2000). Las muestras de tejido recogidas consistieron de un quelopodio o un pereopodo, mismos que pueden ser regenerados. Los individuos fueron capturados a mano o con redes pequeñas de acuario, para luego regresar a los individuos al lugar de la captura. Inmediatamente después de retirar la muestra de tejido, ésta fue colocada en un vial conteniendo etanol 95%. Todas las muestras recogidas fueron almacenadas en el Museo Nacional de Ciencias Naturales, CSIC, Madrid, España.

Tabla 1. Información de las poblaciones de *Austropotamobius italicus* analizadas. El número de individuos incluidos para cada población en total está indicado, así como el usado para cada análisis en paréntesis. Como referencia, las designaciones de los taxa se hacen de acuerdo a Fratini *et al.* 2005.

Punto	Localidad	Región (Basin)	n	Filogenia (n) Conjunto I 16S	Diversidad Conjunto II COIS ^c Haplotipo (n)	IM y BSP Conjunto III COIS ^c (n)	NCA Conjunto IV Haplotipo (n) 16S+COIS ^c +COI3 ^c	SAMOVA k	Taxon
1	Fresnedilla, Jaen, ES	Guadalquivir	3	Clade I (3)	3(2)7(1)	3	II(2)II(1)	2	<i>A. i. italicus</i>
2	Vadillo, Jaen, ES	Guadalquivir	3	Clade I (3)	3(3)	3	I(3)	1	<i>A. i. italicus</i>
3	Linarejos, Jaen, ES	Guadalquivir	3	Clade I (3)	3(3)	3	I(3)	1	<i>A. i. italicus</i>
4	Borosa, Jaen, ES	Guadalquivir	3	Clade I (3)	3(3)	3	I(3)	1	<i>A. i. italicus</i>
5	Aguamula, Jaen, ES	Guadalquivir	3	Clade I (3)	3(2)8(1)	3	II(2) XVI(1)	1	<i>A. i. italicus</i>
6	Coto Rios, Jaen, ES	Guadalquivir	4	Clade I (4)	3(3)8(1)	4	I(3) XVI(1)	1	<i>A. i. italicus</i>
7	Cazorla, Jaen, ES	Guadalquivir	3	Clade I (3)	3(3)	3	I(3)	1	<i>A. i. italicus</i>
8	Cabañeros, Granada, ES	Guadalquivir	3	Clade I (3)	3(1)4(1)5(1)	3	VI(1)VII(1)XIV(1)	3	<i>A. i. italicus</i>
9	Almijara, Granada, ES	Guadalquivir	2	Clade I (2)	3(3)	2	I(2)	1	<i>A. i. italicus</i>
10	Arenas del Rey, Granada, ES	Guadalquivir	3	Clade I (3)	3(3)	3	I(3)	1	<i>A. i. italicus</i>
11	Sillar Baja, Granada, ES	Guadalquivir	3	Clade I (3)	3(3)	3	I(3)	1	<i>A. i. italicus</i>
12	Fraila, Granada, ES	Guadalquivir	3	Clade I (3)	3(3)	3	I(3)	1	<i>A. i. italicus</i>
13	Campoletar, Granada, ES	Guadalquivir	3	Clade I (3)	6(1)	3	II(2)II(1)	1	<i>A. i. italicus</i>
14	Loja, Granada, ES	Guadalquivir	2	Clade I (2)	3(2)	2	I(2)	1	<i>A. i. italicus</i>
15	Quentar, Granada, ES	Guadalquivir	3	Clade I (3)	3(3)	3	I(3)	1	<i>A. i. italicus</i>
16	Gójar, Granada, ES	Guadalquivir	3	Clade I (3)	3(3)	3	I(3)	1	<i>A. i. italicus</i>
17	Arroyo Granada, ES ^a	Guadalquivir	1	-	2(1)	1	-	12	<i>A. i. italicus</i>
18	Arroyo Guadix, Granada, ES ^b	Guadalquivir	1	-	10(1)	1	-	4	<i>A. i. italicus</i>
19	Bco. de Fago, Aragón, ES	Ebro	3	Clade I (3)	3(2)8(1)	3	XVI(1)	1	<i>A. i. italicus</i>
20	Rivabellosa, La Rioja, ES	Ebro	3	Clade I (3)	3(3)	3	V(3)	1	<i>A. i. italicus</i>
21	El Rasillo, La Rioja, ES	Ebro	3	Clade I (3)	3(3)	3	IV(3)	1	<i>A. i. italicus</i>
22	Leza, La Rioja, ES	Ebro	3	Clade I (3)	3(3)	3	IV(3)	1	<i>A. i. italicus</i>
23	Rigobundo, Aragón, ES	Ebro	3	Clade I (3)	3(3)	3	IV(3)	1	<i>A. i. italicus</i>
24	Faldetores, La Rioja, ES	Ebro	3	Clade I (3)	3(3)	3	IV(3)	1	<i>A. i. italicus</i>
25	Pon de Suert, ES	Ebro	10	Clade I (16)	8(9)11(1)	10	XII(1)XV(8)XVI(1)	1	<i>A. i. italicus</i>
26	Río Zadoya, Álava, ES	Ebro	2	Clade I (2)	3(2)	2	IV(2)	1	<i>A. i. italicus</i>
27	Roncesvalles, Navarra, ES ^a	Ebro	1	-	2(1)	1	-	11	<i>A. i. italicus</i>

1. Estructura mitocondrial de *Austropotambius italicus*

28	Beceite, Valderrobres, ES ^a	EbroII	1	-	21(1)	1	-	10	<i>A. i. italicus</i>
29	Asabón, Aragón, ES	EbroII	3	Clade I (3)	3(3)	3	I(3)	1	<i>A. i. italicus</i>
30	Valhondo, Aragón, ES	EbroII	3	Clade I (3)	3(3)	3	I(3)	1	<i>A. i. italicus</i>
31	Homero, Aragón, ES	EbroII	3	Clade I (3)	8(3)	3	XVI(3)	1	<i>A. i. italicus</i>
32	Amanaderos, Aragón, ES	EbroII	3	Clade I (3)	8(3)	3	XVI(3)	1	<i>A. i. italicus</i>
33	Montsant, Catalunya, ES	EbroII	4	Clade I (4)	8(4)	4	XVI(4)	1	<i>A. i. italicus</i>
34	Molí de l'Esquirola, Catalunya, ES	EbroII	3	Clade I (3)	8(3)	3	XVI(3)	1	<i>A. i. italicus</i>
35	Ports de Besit, ES	EbroII	10	Clade I (3)	3(3)8(7)	10	I(3) XVI(7)	1	<i>A. i. italicus</i>
36	Guajar, Granada, ES	Independent (Guadalfeo)	3	Clade I (3)	3(3)	3	I(3)	1	<i>A. i. italicus</i>
37	Cabra, Córdoba, ES	Independent (Guadajoz)	3	Clade I (3)	3(3)	3	I(3)	1	<i>A. i. italicus</i>
38	Valdepeñas, Jaen, ES	Independent (Guadajoz)	3	Clade I (3)	3(3)	3	I(3)	1	<i>A. i. italicus</i>
39	Montejique, Málaga, ES	Independent (Guadiaro)	3	Clade I (3)	3(2)5(1)	3	I(2) VI(1)	1	<i>A. i. italicus</i>
40	Ronda, Málaga, ES	Independent (Guadiaro)	3	Clade I (3)	3(3)	3	I(3)	1	<i>A. i. italicus</i>
41	Yunquera, Málaga, ES	Independent (Guadalhorce)	3	Clade I (3)	3(3)	3	I(3)	1	<i>A. i. italicus</i>
42	Alcaucin, Málaga, ES	Independent (Vélez)	3	Clade I (3)	3(3)	3	I(3)	1	<i>A. i. italicus</i>
43	Vites, Jaen, ES	Independent (Segura)	3	Clade I (3)	3(3)	3	I(3)	1	<i>A. i. italicus</i>
44	Zucaina, Valencia, ES	Independent (Mijares)	3	Clade I (3)	3(3)	3	I(3)	1	<i>A. i. italicus</i>
45	Arco de las Salinas, Valencia, ES	Independent (Turia)	3	Clade I (3)	3(3)	3	I(1) XVI(2)	1	<i>A. i. italicus</i>
46	Higuera, Valencia, ES	Independent (Mijares)	3	Clade I (3)	3(3)	3	XVI(3)	1	<i>A. i. italicus</i>
47	Tiaguas, Valencia, ES	Independent (Turia)	3	Clade I (3)	3(3)	3	I(3)	1	<i>A. i. italicus</i>
48	Campo de Arriba, Valencia, ES	Independent (Turia)	3	Clade I (3)	3(3)	3	XVI(3)	1	<i>A. i. italicus</i>
49	Río Nervión, Álava, ES	Northern Spain (Nervión)	2	Clade I (2)	3(2)	2	IV(2)	1	<i>A. i. italicus</i>
50	Lake Ercina, ES	Northern Spain (Lake Ercina)	4	Clade I (4)	3(4)	4	V(4)	1	<i>A. i. italicus</i>
51	Orozco, Tolosa, ES ^a	Northern Spain (Nervión)	1	-	21(1)	1	-	11	<i>A. i. italicus</i>
52	Garrotxa, Catalunya, ES	East Pyrenees (Fluvià)	10	Clade I (10)	3(9)10(1)	10	I(6) X(3)XIII(1)	1	<i>A. i. italicus</i>
53	Albera, Catalunya, ES	East Pyrenees (Muga)	10	Clade I (10)	3(8)12(1)13(1)	10	I(8) XX(1)XXI(1)	1	<i>A. i. italicus</i>
54	Salines, Catalunya, ES	East Pyrenees (Muga)	21	Clade II	16(16)17(5)	-	-	1	<i>A. i. italicus</i>
55	Sant Genís, Figueres, ES ^b	East Pyrenees (Muga)	1	-	10(1)	1	-	5	<i>A. i. italicus</i>
56	Fondrais, ES	East Pyrenees (Besós)	4	Clade I (4)	9(1)14(2)15(1)	4	VIII(2)XI(1)XI(1)	1	<i>A. i. italicus</i>
57	Riudaria, Catalunya, ES	East Pyrenees (Ter)	3	Clade I (3)	3(3)	3	I(3)	1	<i>A. i. italicus</i>
58	Les Preses, Catalunya, ES	East Pyrenees (Fluvià)	3	Clade I (3)	3(3)	3	I(3)	1	<i>A. i. italicus</i>
59	Pujol Avencó, Catalunya, ES	East Pyrenees (Besós)	2	Clade I (2)	3(2)	2	I(2)	1	<i>A. i. italicus</i>
60	Redipollos, Riano, León, ES ^a	Duero	1	-	21(1)	1	-	7	<i>A. i. italicus</i>
61	Tortullas, Miranda do Douro, PT ^b	Duero	1	-	10(1)	1	-	6	<i>A. i. italicus</i>

1. Estructura mitocondrial de *Austropotamobius italicus*

62	Torrente Sovara, Arezzo, IT	Tiber	10	Clade I (10)	19(10)	10	XVIII(2)XVIII(4) IXX(4)	13	<i>A. i. italicus</i>
63	Papiano, Arezzo, IT ^a	Tiber	1	-	21(1)	1	-	12	-
64	Resco Simontano, IT	Arno	4	Clade I (4)	11(2)2(2)	-	XXII(2)XXIII(2)	-	<i>A. i. carinthiacus</i>
65	Sondrio, IT	Po (Adda)	5	Clade II (5)	(8)5	-	-	9	<i>A. i. cariscus</i>
66	Claro, Bellinzona, CH ^a	Po	1	-	22(1)	1	-	9	<i>A. i. italicus</i>
67	Cugnasco, Lugano, CH ^a	Po	1	-	22(1)	1	-	9	<i>A. i. italicus</i>
68	Meride, Lugano, CH ^a	Po	1	-	22(1)	1	-	9	<i>A. i. italicus</i>
69	Montecrestese, Domodossola, IT ^a	Po (Siresa)	1	-	22(1)	1	-	9	<i>A. i. italicus</i>
70	Sagliano, Voghera, IT ^a	Po	1	-	22(1)	1	-	9	<i>A. i. italicus</i>
71	Ortone, Piacenza, IT ^a	Po	1	-	22(1)	1	-	9	<i>A. i. italicus</i>
72	Nirano, Sassuolo, IT ^a	Po	1	-	21(1)	1	-	12	<i>A. i. italicus</i>
73	Casalzuigno, Varese, IT ^a	Po (Ticino)	1	-	22(1)	1	-	9	<i>A. i. italicus</i>
74	Bracchio, Verbania, IT ^a	Po (Ticino)	1	-	20(1)	1	-	8	<i>A. i. italicus</i>
A29, A30	Bologna, IT ^c	Po	2	Clade I (1)	-	-	-	-	<i>A. i. italicus</i>
A31	Las Lillas, FR ^c	-	1	Clade I (1)	-	-	-	-	<i>A. i. italicus</i>
A35	Las Lillas, FR ^c	-	1	Clade II (1)	-	-	-	-	<i>A. i. meridionalis</i>
ESP	San Esteban, ES ^c	Canabrie	1	Clade I (1)	-	-	-	-	<i>A. i. italicus</i>
A32	Giare, FR ^c	Giare	1	Clade I (1)	-	-	-	-	<i>A. i. italicus</i>
ESP	Tafalla, ES ^c	Ebro	1	Clade I (1)	-	-	-	-	<i>A. i. italicus</i>
A33, A34	Plansee, AT ^c	Danube	2	Clade I (1)	-	-	-	-	<i>A. i. carinthiacus</i>
A28	Rizana, SL ^c	Rizana	1	Clade II (1)	-	-	-	-	<i>A. i. meridionalis</i>
ESP	Navarra, ES	-	1	Clade I (1)	-	-	-	-	<i>A. i. italicus</i>
S4	Cugnasco, IT ^d	Po	1	Clade I (1)	-	-	-	-	<i>A. i. carinthiacus</i>
N1	Éyrieux/Douv, Lamastre, FR ^d	Rhone	1	Clade I (1)	-	-	-	-	<i>A. i. carinthiacus</i>
SW1	Laie Grond, Laax, GR ^d	Po	1	Clade I (1)	-	-	-	-	<i>A. i. carinthiacus</i>
SW2	Sous le Cox, Massongez, VS ^d	Po	1	Clade I (1)	-	-	-	-	<i>A. i. carinthiacus</i>
V1, V2	Mont Berici, Vicenza, IT ^d	Adige	2	Clade II (1)	-	-	-	-	<i>A. i. cariscus</i>
A3	Modolena, IT ^d	Po	1	Clade I (1)	-	-	-	-	<i>A. i. carinthiacus</i>
Bs	Chiese, Brescia, IT ^e	Po	1	Clade II (1)	-	-	-	-	<i>A. i. cariscus</i>
VAR	Throughout Po watershed ^e	Po	1	Clade I (1)	-	-	-	-	<i>A. i. carinthiacus</i>
Ard	Ardi Versa, Rovescala, IT ^e	Po	1	Clade I (1)	-	-	-	-	<i>A. i. carinthiacus</i>
Ver	Versa, Rovescala, IT ^e	Po	1	Clade I (1)	-	-	-	-	<i>A. i. carinthiacus</i>
Vis	Bormida, Visone, IT ^e	Po	1	Clade II (1)	-	-	-	-	<i>A. i. meridionalis</i>
A1	^{#f}	Po, Magra	1	Clade I (1)	-	-	-	-	<i>A. i. carinthiacus</i>

1. Estructura mitocondrial de *Austropotambius italicus*

A2	Lambro, IT ^f	Po	1	Clade I (1)	-	-	-	<i>A. i. carinthiacus</i>
A3, A10	# ^f	Po, Magra	2	Clade I (1)	-	-	-	<i>A. i. carinthiacus</i>
A4	Rosandra, IT ^f	Rosandra	1	Clade II (1)	-	-	-	<i>A. i. carsicus</i>
A6, A7	Farfereta, IT ^f	Arno	2	Clade I (1)	-	-	-	<i>A. i. italicus</i>
A8	# ^f	Bidente-Ronco, Arno	1	Clade I (1)	-	-	-	<i>A. i. italicus</i>
A9	Duranna, IT ^f	Tiber	1	Clade II (1)	-	-	-	<i>A. i. meridionalis</i>
A13	# ^f	Po, Crati, Sele	1	Clade II (1)	-	-	-	<i>A. i. meridionalis</i>
A14	# ^f	Tiber, Sele	1	Clade II (1)	-	-	-	<i>A. i. meridionalis</i>
A15, A16, A17	Lambro, IT ^f	Po	3	Clade II (1)	-	-	-	<i>A. i. carsicus</i>
A18	Lake Caldonazzo, IT ^f	Brenta	1	Clade II (1)	-	-	-	<i>A. i. carsicus</i>
SS2	Gravi, Lemme, IT ^e	Po	1	-	-	-	-	<i>A. pallipes</i>
Ap2	Gace, FR ^c	Rhone	1	-	-	-	-	<i>A. pallipes</i>
Ap3	Genes, FR ^c	**	1	-	-	-	-	<i>A. pallipes</i>
At1	^c	**	1	-	-	-	-	<i>A. torrentium</i>
At2	^g	**	1	-	-	-	-	<i>A. torrentium</i>

Los superíndices indican secuencias provenientes de estudios previos: ^a Iaconelli (2001), sólo el fragmento COI 5' disponible; ^b Trontelj *et al.*, (2005), sólo el fragmento COI 5' disponible; ^c Grandjean *et al.* 2000 (16S); ^d Largiader *et al.* (2000); ^e Zaccara *et al.* 2004; ^f Fratini *et al.* 2005; ^g Schubart y Huber 2006. La secuencia de Navarra fue subida por Berioz *et al.* Los países de origen de las muestras son designados de acuerdo al código ISO: IT Italia, PT Portugal, ES España, CH Suiza. * muestras de varias localidades en una región; ** muestras provenientes de varias regiones.

El ADN genómico fue extraído por medio de un método estándar de fenol : alcohol isoamílico diclorometano (24:24:1) seguido de precipitación con etanol (Sambrook *et al*, 1989). Los trabajos anteriores no siempre han analizado los mismos fragmentos mitocondriales. De esta forma, para poder llevar a cabo la más amplia comparación posible hemos diseñado las siguientes estrategias (por referencia a los conjuntos de datos ver Figura 2 y Tabla 1). A fin de asignar las muestras al escenario filogenético propuesto en estudios previos (Fratini *et al*, 2005; Grandjean *et al*, 2002a; Grandjean *et al*, 2000; Largiader *et al*, 2000), se utilizó un fragmento del 16S ADNr (conjunto de datos I), junto con 45 secuencias homólogas disponibles en GenBank para *A. italicus*, así como tres secuencias de *A. pallipes* y dos de *A. torrentium* que se incluyeron como grupos externos (n = 252 muestras). 2) Se utilizaron 657 pares de bases de la porción 5' del citocromo oxidasa subunidad I (COI) de 241 especímenes de *A. italicus* (18 secuencias de GenBank, correspondientes al conjunto de datos II) para inferir diferentes parámetros de genética de poblaciones como la identificación de haplotipos y los índices de diversidad genética. Además, para inferir los procesos históricos de las poblaciones el esquema de datación, se utilizó un subconjunto sólo con secuencias asignadas a *A. i. italicus* del gen COI (conjunto de datos III, 211 muestras, 657 pb), lo que permitió aplicar el modelo de aislamiento-mutación (IM) y la estimación demográfica por medio de un Bayesian Skyline Plot (BSP) y análisis de mismatch. 3) Dos fragmentos del gen COI (1196 pb) y el fragmento de ADNr 16S de todas las muestras se utilizaron conjuntamente en un Análisis de Clado Anidados (NCA) para probar la relación entre posibles patrones históricos en la estructura de las poblaciones y la distribución geográfica (conjunto de datos IV, 197 muestras, 1720 pb).







Data set		Analyses	bp(n)	Included
I		Phylogeny	524 (252)	All <i>A. italicus</i> sub-species
II		Genetic diversity	657 (241)	<i>A. italicus</i> IT+ES
III		Demography	657 (211)	<i>A. i. italicus</i> lineage IT+ES
IV	  	NCA	1720 (197)	<i>A. italicus</i> IT+ES, complete mt sequences
	16S COI5' COI3'			

Figura 2. Esquema mostrando los distintos conjuntos de datos usados en este estudio. Su uso se decidió de acuerdo a la posibilidad de pertenencia para los diferentes análisis, y para cubrir la mayor variación genética disponible de estudios previos. El conjunto de datos I se compuso de secuencias del fragmento 16S, y fue usado en los análisis filogenéticos porque proveía la representación geográfica más amplia y para localizar las muestras de este estudio en el contexto taxonómico propuesto previamente. El conjunto de datos II se compuso del fragmento 5' del COI, usado para las estimas de parámetros genéticos de diversidad y comparaciones de las poblaciones, ya que proveía de la variación más adecuada para el estudio de poblaciones y permitir su comparación con estudios previos. El conjunto de Datos III era más reducido que los anteriores, dado que fue utilizado para describir la variabilidad en la subespecie *A. i. italicus* y estimar los parámetros demográficos y la datación. El conjunto de datos IV incluía la totalidad de la información mitocondrial obtenida de las muestras obtenida para el presente estudio para describir el Análisis de clados anidados (NCA), al contener la información mitocondrial más amplia para la Península Ibérica.

El gen COI se amplificó en dos fragmentos utilizando los cebadores ORCO1F (5'-AACGCAACGATGATTTTTTCTAC-3'; (Taylor y Hardman, 2002) y ApaCOI1H (5'-ATAGCGACTATAGCATAAATTATC-3', este estudio) para la región 5' y C1-2183-J (5'-CAACATTTATTTTGATTTTTTGG-3'; (Simon *et al*, 1994)) y COI *Scylla* (5'-TTAAGTCCTAGAAAATGTTGRGGGA-3'; (Gopurenko *et al*, 1999) para el fragmento 3'. Además, fue llevada a cabo una amplificación selectiva del fragmento mitocondrial 16S rARN con los cebadores 16S-1471 y 16S-1472 (Crandall y Jr Fitzpatrick, 1996). Las amplificaciones de PCR se llevaron a cabo en reacciones de 25

μ L con: 1x tampón de PCR, 0,5 μ M de cada cebador, 0,2 mM de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl₂, 1 U de Taq polimerasa (Biotools) y alrededor de 50 ng de ADN. El perfil térmico para las amplificaciones de PCR fue como sigue: 3 min a 94 °C (un ciclo), 30 s a 94 °C, 30 s a 48 °C y 60 s a 72 °C (30 ciclos), seguidos de una extensión final de 4 min a 72 °C. Los productos de PCR fueron visualizados en geles de agarosa al 1,0% (1x TBE), teñidos con SYBR-Safe (Invitrogen). Los fragmentos fueron secuenciados en un Analizador de ADN ABI 3730. Las secuencias parciales de los fragmentos de COI y 16S rRNA fueron alineados con el programa de ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) tal como se aplica en la versión MEGA 4 (Tamura *et al.*, 2007). En el caso del gen COI, se llevaron a cabo las recomendaciones para detectar la presencia de nmtADN (pseudogenes) en cada secuencia. Éstas incluyeron la identificación de codones stop y niveles inusuales de divergencia genética y substituciones no sinónimas en muestras provenientes de una misma población (Buhay, 2009).

1.2.2 Análisis filogenéticos

Para inferir el marco filogenético más completo posible se analizaron 526 pb del gen 16S rARN de 252 muestras de *A. italicus*. La inferencia filogenética fue llevada a cabo sólo con este fragmento mitocondrial porque es del que se dispone la más amplia representación de la variación genética de estudios anteriores y porque ninguna combinación de datos fue adecuada debido a la no superposición de los conjuntos de datos de GenBank. Los intentos anteriores realizados para analizar una matriz combinada resultaron en la agrupación artificial de los conjuntos de datos por separado. Además, con el fin de identificar el modelo evolutivo más apropiado por el criterio de información corregido de Akaike (AICc), se utilizó el programa jModeltest v0.1.1 (Posada, 2008). Los análisis filogenéticos se realizaron utilizando Máxima

Verosimilitud con el programa PhyML (Guindon y Gascuel, 2003). Para evaluar el soporte de los nodos por medio se llevaron a cabo 1.000 réplicas de bootstrap no paramétrico siguiendo el modelo evolutivo que más se ajustaba a nuestros datos. Este modelo también fue utilizado para llevar a cabo Inferencia Bayesiana de la filogenia como se aplica en MrBayes v3.1.2 (Rönquist y Huelsenbeck, 2003), mediante la aplicación de un procedimiento de Cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC) durante 5×10^6 generaciones. La convergencia entre los parámetros de cada corrida en dos análisis simultáneos (4 cadenas por corrida), y la longitud de la serie fueron ajustados teniendo en cuenta la desviación estándar promedio de las estimas $<0,01$ (Huelsenbeck y Rönquist, 2005). El período de “burn-in” (o descartar generaciones) se determinó como el conjunto de árboles encontrados antes de la estabilización de la probabilidad y la convergencia, utilizando el programa Tracer v1.5 (Rambaut y Drummond, 2007). De igual manera, Tracer v1.5 se utilizó para comprobar si la convergencia entre las cadenas de las corridas y los valores óptimos de los parámetros de ejecución.

1.2.3 Diversidad genética e historia demográfica

Con el fin de evaluar los parámetros de diversidad genética se utilizaron 657 pb del fragmento 5' del COI (Conjunto de datos IV, cuadro 1) correspondientes a 241 muestras de *A. i. italicus* de la Península Ibérica e Italia. Este fragmento fue utilizado con el fin de que los resultados sean comparables con otros estudios sobre los parámetros genéticos de poblaciones de *A. i. italicus* de otras regiones (Trontelj *et al.*, 2005), mientras que para el fragmento 5' del COI, el trabajo anterior sólo tenía secuencias de la cuenca del río Po (Zaccara *et al.*, 2004). Las regiones geográficas de la Península Ibérica se determinaron de acuerdo a las cuencas hidrológicas de muestreo

(ver Tabla1). El programa DnaSP v5 (Librado y Rozas, 2009) se utilizó para generar una distribución de haplotipos de acuerdo a la regionalización propuesta. Además, para cada región geográfica considerada, fueron calculadas la diversidad de haplotipos mitocondriales (HD) y la diversidad nucleotídica (π). Como los tamaños de muestra disponibles eran considerablemente diferentes las poblaciones ibéricas e italianas, se llevó a cabo un procedimiento de rarefacción para evaluar los posibles efectos sobre la riqueza de haplotipos, conforme el aumento del número de muestras, con el programa EstimateS (Colwell, 2009). El estimador de riqueza no paramétrico Chao1 fue usado para estimar la influencia de los haplotipos únicos sobre el tamaño acumulativo de localidades de muestreo (Chao, 1987).

Hay pruebas de que los cambios climáticos han sido decisivos para la distribución y la historia reciente de la población de varias especies de agua dulce en Europa. Con el fin de detectar posibles huellas de los cambios demográficos o la selección en la historia reciente de *A. i. italicus*, se evaluó la posibilidad de desviaciones de un modelo de equilibrio mutación-deriva utilizando el fragmento 5' de las poblaciones de la Península Ibérica y e italianas sólo teniendo en cuenta las asignadas a *A. i. italicus* (conjunto de datos III, n = 191 y 657 pb, ver cuadro 1). Este fragmento fue utilizado para incluir los haplotipos más cercanos reportados anteriormente (Trontelj *et al.*, 2005), mientras que el fragmento 3' del COI no se utilizó porque las secuencias disponibles se limitaban a la cuenca del río Po (Zaccara *et al.*, 2004). Utilizamos las dos pruebas más pertinentes para detectar desviaciones de la neutralidad debidas a la expansión de la población: las pruebas de neutralidad F_S de Fu (Fu, 1997) y R_2 (Ramos-Onsins y Rozas, 2002) (con 1000 pseudo-réplicas en DnaSP). La prueba F_S de Fu es especialmente sensible al exceso de haplotipos raros (Fu, 1997; Ramos Onsins y Rozas, 2002), para lo cual toma

valores bajos o negativos con el exceso de mutaciones únicas causadas por la expansión de la población. R_2 utiliza la información de los sitios de segregación, y es más potente cuando se considera un pequeño número de sitios segregantes (Ramos-Onsins y Rozas, 2002). La neutralidad también se evaluó por medio de la probabilidad de obtener valores del estimador de la irregularidad de r ("ragedeness") menor que la observada, el cual fue calculado mediante el algoritmo coalescente en DnaSP por medio de 1000 pseudo-réplicas con un inicio aleatorio y sin asumir recombinación. Las pruebas de la neutralidad D de Tajima (Tajima, 1989) y F^* de Fu y Li (Fu y Li, 1993) también se utilizaron para evaluar los cambios en la historia demográfica.

Adicionalmente, utilizando la misma matriz de nucleótidos, se llevó a cabo un análisis de "mismatch", mismo que muestra la distribución del número de diferencias entre pares de secuencias, utilizando el programa DnaSP. La expansión de una población habitualmente resulta en una curva (una "ola") en la distribución de mismatches, mientras que tamaños de población estables suelen mostrar una distribución multi-modal (Harpending, 1994, Rogers y Harpending, 1992). Se utilizaron valores iniciales de $\theta_0=0$, y $\theta_1=99\ 999$. Para obtener el tiempo aproximado correspondiente con un posible evento de expansión dando lugar a las poblaciones ibéricas de *A. i. italicus*, se utilizó el parámetro de expansión $\tau=2\mu t$, obtenido en el análisis, donde μ es la tasa de mutación y t es el tiempo en generaciones desde la expansión. El parámetro τ es una estimación del tiempo después de la expansión (t) en unidades de mutación. Entonces, si son conocidos la tasa de divergencia por nucleótidos y año ($u = 2\mu$, donde μ es la tasa de sustitución por linaje) y el número de nucleótidos del fragmento analizado (l), es posible calcular la edad en que la expansión ha ocurrido con la expresión $\tau = 2ut$, por lo que hemos $t = \tau / 2u$ (modificado de (Harpending *et al.*, 1993).

Fueron consideradas tres tasas de divergencia del COI en otros crustáceos: 1,66% de divergencia por millón de años (Ma) estimada para cangrejos grápsidos (Knowlton y Weigt, 1998), 2,6% Ma obtenidos para alféidos (Knowlton *et al*, 1993) y 1,4% PMA (Cook *et al*, 2008; Knowlton y Weigt, 1998) como una tasa aproximada de divergencia promedio reportada para crustáceos. Se consideró un tiempo de generación de dos años para las especies de cangrejos de río (Hobbs, 1991) y proporciones sexuales iguales.

Por último, para revelar los cambios en la diversidad genética en relación al tiempo en las poblaciones de la ibéricas e italianas (una medida del tamaño efectivo de la población en virtud de la evolución neutral) se infirió un “Bayesian Skyline Plot” (BSP) para cada grupo de poblaciones en el programa BEAST v1.5.3 (Drummond y Rambaut, 2007). En cada caso, las cadenas de MCMC consistieron en 5×10^7 generaciones. La convergencia en las corridas fue evaluada visualmente con el apoyo del programa Tracer v1.5 y la incertidumbre en las estimaciones de los parámetros fue considerada de acuerdo a los valores de la densidad de probabilidad mayor al 95% (HPD). Debido a la utilización de tamaños de muestra contrastantes y que esto puede afectar las estimas de tamaño poblacional, se diseñó un esquema de muestreo aleatorio construyendo 10 matrices adicionales con 20 secuencias ibéricas elegidas al azar, de forma que pudieran ser comparadas con el tamaño mínimo de la matriz italiana. Para estas matrices fueron estimados los parámetros demográficos usando el BSP como se detalla antes.

1.2.4 Análisis filogeográfico

La estructura genética global de *A. i. italicus* fue explorada usando un Análisis Espacial de la Varianza Molecular (SAMOVA) (Dupanloup *et al.*, 2002). Este método define k poblaciones continuas y homogéneas pero diferenciadas genéticamente, mientras maximiza la proporción de varianza genética total (F_{CT}). SAMOVA fue corrida considerando un intervalo de $k = 2$ a $k = 15$, con 500 procesos simulado de alineamiento. Cada corrida se repitió tres veces para comprobar una consistencia adecuada. Para este análisis se utilizó el conjunto de datos de 657 pb, incluyendo 211 muestras procedentes de la Península Ibérica y la Península italiana, mismas que fueron agrupadas de acuerdo a la cuenca de procedencia (Tabla 1).

Como un método complementario a las utilizados anteriormente, y teniendo en cuenta las limitaciones y desventajas del Análisis de Clados Anidados (NCA por sus siglas en inglés) (Panchal y Beaumont, 2007; Petit, 2008), hemos probado las asociaciones geográficas entre los haplotipos y clados, con base en la red de haplotipos más parsimoniosa seguida de un NCA (Templeton, 1998, 2001). Sólo dos poblaciones de Francia con individuos de *A. i. italicus* han sido encontradas con anterioridad, Les Liles (en la que cohabita con *A. pallipes*), y Garrel (Grandjean *et al.*, 2000). Por esta razón ha sido sugerido su origen por translocación humana (Grandjean *et al.*, 2000; Souty-Grosset *et al.*, 2006.). No es posible, sin embargo, descartar la posibilidad de perder la representación de haplotipos de estas poblaciones, pero parece difícil que un gradiente de haplotipos pueda existir en ellas. Además, debido a esta limitación de muestreo, se utilizó el NCA para examinar posibles asociaciones geográficas entre los clados de la península Ibérica, análisis que incluyó las dos poblaciones italianas más

cercanas filogenéticamente como referencia (las poblaciones de 62 y 64). Para tener en cuenta para la mayor parte de la información mitocondrial, se utilizó el conjunto de datos IV ($n = 197$, $16S + COI = 1720$ pb, Figura 2, Tabla 1) compuesto por secuencias obtenidas en este estudio. En primer lugar, se utilizó el programa TCS v1.21 (Clemente *et al.*, 2000) para construir la red de haplotipos más parsimoniosa que ilustrara los pasos de mutación entre las secuencias. El programa GEODIS v2.6 (Posada *et al.*, 2000) se utilizó para probar las relaciones significativas entre localidades y las distancias genéticas usando 10000 permutaciones aleatorias.

Las inferencias biológicas para clados que mostraron una asociación geográfica significativa se llevaron a cabo aplicando la correspondiente clave de inferencia actualizada (15 de diciembre de 2008, disponible en http://darwin.uvigo.es/download/geodisKey_28Apr09.pdf; (Templeton, 2004)) y de esta manera determinar qué procesos históricos más probablemente pueden explicar los patrones actuales.

1.2.5 Modelo de Asilamiento-Mutación

Para abordar los dos escenarios propuestos consistentes en la colonización natural de la Península Ibérica o la introducción antropogénica desde Italia, se aplicó el modelo de aislamiento-mutación, como una herramienta para poner a prueba la hipótesis de un escenario en que se comparte la historia evolutiva reciente de las poblaciones ibéricas e italianas de *A. i. italicus*. Por lo tanto, se propuso una población única para ambos grupos en el pasado en la que inicialmente habría un flujo genético y una posterior división entre ellos, llevando a cabo una comparación por pares para las estimaciones

genealógicas de la diversidad (θ_1 , θ_2 , θ_{Ancestor}) y tiempo de separación utilizando el programa de IM (modelo de aislamiento-migración, Hey, 2005; Nielsen y Wakeley, 2001; Won *et al*, 2005; <http://lifesci.rutgers.edu/heylab/-heylabsoftware.htm> # IM). Este modelo ha demostrado ser especialmente útil para estimar diferentes parámetros de poblaciones durante un proceso de divergencia como lo son el tiempo desde la separación y los cambios en los tamaños de las poblaciones (Won y Hey, 2005), lo que podría ser útil para estudiar escenarios como el que se aborda en este estudio. Proporcionar un escenario temporal sería especialmente útil para la hipótesis de una única población ancestral entre Italia y las poblaciones ibéricas y una separación posterior. Este modelo asume que una población ancestral de tamaño constante el parámetro de la población θ_A se han separado en dos poblaciones en un tiempo T . T se obtiene en función de la tasa de mutación ($t = T\mu$), de la cual T puede estimarse en años ($T = t / \mu$). Las estimas del tamaño de la población se convirtieron también a partir de θ , expresándose en unidades de mutación ($\theta = 4N\mu$, de la cual $N = \theta/4\mu$).

Cada población descendiente tiene un parámetro de mutación, θ_1 y θ_2 , respectivamente. La comparación se hizo con el conjunto de datos III, ya que incluye la representación más amplia de haplotipos procedentes de la Península Ibérica y el noroeste de Italia (considerado aquí como el linaje *A. i. italicus*, 211 muestras y 657 pb). Las comparaciones se llevaron a cabo agrupando todas las poblaciones ibéricas por un lado, excepto Muga Salinas, y las poblaciones italianas por otro lado. El modelo HKY (Hasegawa-Kishino-Yano), con un escalar de 0,25 correspondiente al ADN mitocondrial se utilizó junto con una semilla aleatoria para iniciar la carrera. Un burn-in de 100 000 pasos fue descartado antes de grabar los pasos genealógicos, y cada comparación fue ejecutada hasta que los tamaños de muestra efectiva (SEE) de todos

los parámetros fueron mayores a 1000. Se diseñaron múltiples corridas independientes con semillas de arranque aleatorias para garantizar que los valores estaban convergiendo en estimaciones similares. Se utilizó una tasa de divergencia del COI de 1,4% PMY (Cook *et al*, 2008;. Knowlton y Weigt, 1998) como una aproximación a la tasa media comúnmente observada en crustáceos.

1.3 RESULTADOS

1.3.1 Filogenia de *Austropotambius italicus*

La filogenia 16S rARN fue inferida para ayudar a asignar las poblaciones de este estudio a las diferentes subespecies identificadas previamente para el complejo de la especie *A. italicus* (Fratini *et al.*, 2005; Grandjean *et al.*, 2000). El modelo evolutivo de sustitución nucleotídica más apropiado fue HKY85 (Hasegawa *et al.*, 1985) con un parámetro gamma de la forma de la distribución de 1,35 y una proporción de sitios invariables de 0,71. La estabilización de la probabilidad de los análisis de BI fue registrada después de descartar un 10% de los estados, siendo los valores de Likelihood de los árboles de -1327,02034 y -1.656,02 para el árbol de ML y de BI, respectivamente. El análisis filogenético de *A. i. italicus* mostró dos clados principales, el Clado I, que contiene muestras atribuidas a *A. i. italicus* y a *A. i. carinthiacus* y el Clado II, que contiene muestras de *A. i. meridionalis* y *A. i. carsicus* (Figura 3). La mayoría de las muestras de Iberia incluidas en el análisis filogenético mostró idénticos haplotipos de 16S rARN, con lo que la asignación de la mayoría de las poblaciones ibéricas a esta subespecie fue clara (Grandjean y Souty Grosset, 2000). La población ibérica del río Muga, Pirineos Orientales (MugaSal) se incluyó en Clado II, junto con las muestras atribuidas a *A. i. meridionalis*.

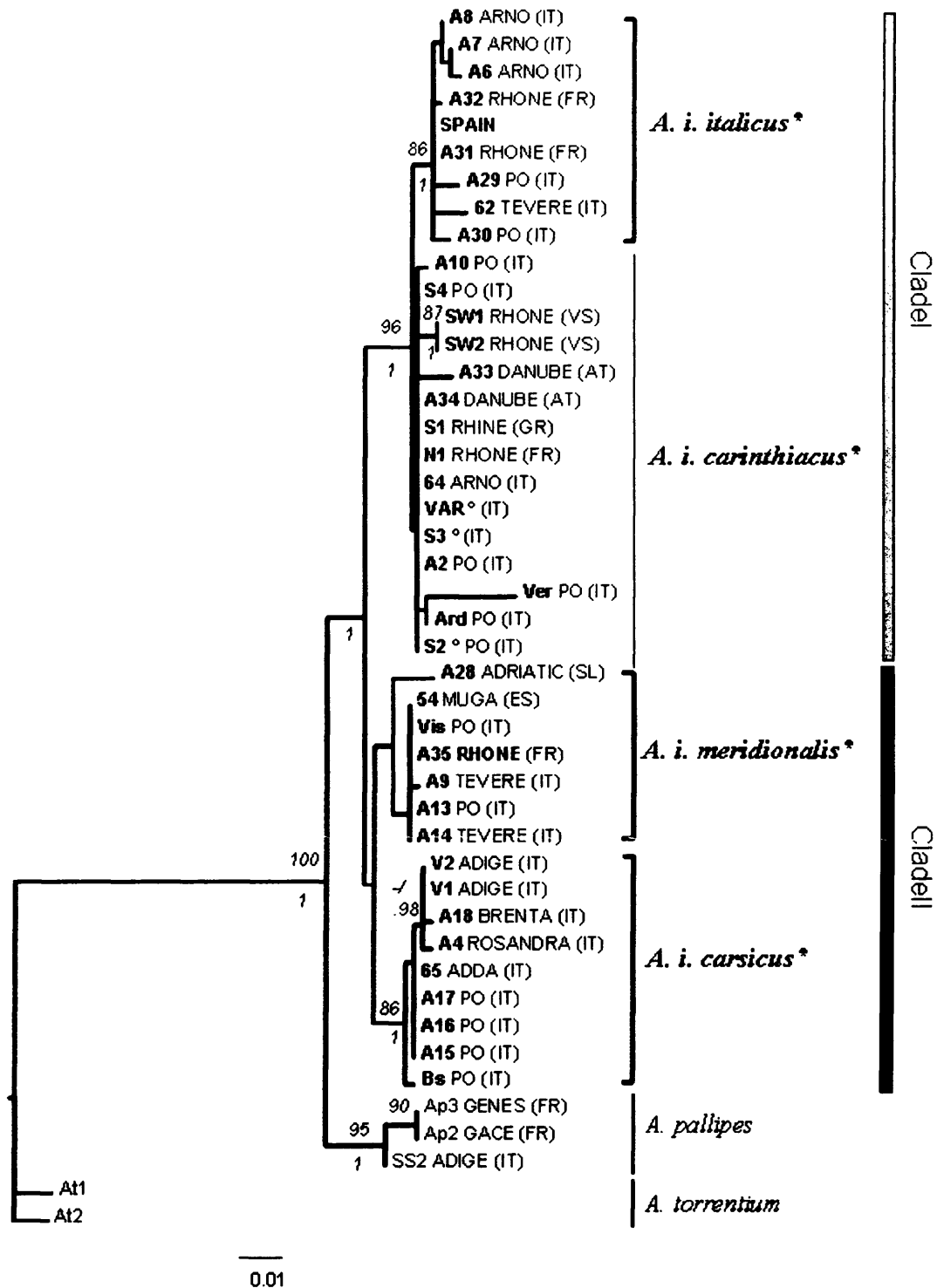


Figura 3. Árbol filogenético derivado del análisis de ML correspondiente al 16S rDNA de las poblaciones de *A. italicus* publicadas, usando el modelo HKY+I+G. Se incluyen tres poblaciones de Italia secuenciadas para este estudio, pertenecientes a las cuatro subespecies de *A. italicus* (Fratini *et al.* 2005), y a 52 poblaciones ibéricas analizadas para este estudio (etiquetadas como SPAIN). Los valores de soporte de bootstrap de los

análisis de ML se dan arriba de los nodos (1000 réplicas) y los de probabilidades posteriores del análisis de inferencia bayesiana se muestran bajo los nodos (5×10^6 generaciones). Sólo se muestran los valores de bootstrap mayores a 80 y de probabilidades posteriores mayores a 0.95. Las etiquetas incluyen los códigos de haplotipos de 16S rDNA (ver material suplementario I), cuenca y país. ° hace referencia a varias cuencas para un solo haplotipo (Zaccara *et al.*, 2004) * se refiere a la subdivisión taxonómica propuesta por Grandjean *et al.*, 2000 y Fratini *et al.*, 2005.

1.3.2 Diversidad haplotípica y nucleotídica

El análisis de haplotipos del fragmento 5' del COI, mostró 15 haplotipos que se encuentran exclusivamente en la Península Ibérica, así como cuatro exclusivos a las poblaciones italianas (Tabla 1). Dos haplotipos (haplotipos 10 y 21) fueron compartidos entre ambas regiones, mientras que la mayoría de los haplotipos se encontraron en bajas frecuencias existiendo un haplotipo común (haplotipo 3), que se observa en el 70% de las poblaciones ibéricas. Las curvas de rarefacción no mostraron ningún efecto aparente a consecuencia de diferentes tamaños de muestra, observación derivada del estimador Chao1, que resultó en menores valores para las poblaciones italianas que para las poblaciones ibéricas en los mismos puntos acumulativos. Además, la curva de las poblaciones de ibéricas no alcanzó a una asíntota, lo que significa que incluso más haplotipos cabría esperar si se añadieran más poblaciones al muestreo.

En general, los valores de diversidad genética (π y H_d) eran mucho más bajos para los ríos ibéricos que para los italianos ($\pi=39 \pm 0.000$; $H_d=0.121 \pm 0.032$ y $\pi=94 \pm 0.0006$; $H_d=0.671 \pm 0.066$, respectivamente). En la Península Ibérica, la cuenca

del Ebro fue la región más diversa en cuanto a la diversidad haplotípica, mientras que la cuenca del Guadalquivir fue la que mostró la menor diversidad haplotípica (Tabla 2). Sin embargo, la región de los Pirineos Orientales, que incluye a las poblaciones del río Muga, fue la región con el mayor número sitios polimórficos promedio ($k = 0,911$) y también con la mayor diversidad nucleotídica ($\pi = 0,0014 \pm 0,0002$).

Tabla 2. Diversidad genética en diferentes áreas de *A. i. italicus*, usando el conjunto de datos II, del gen COI .

Region/group	n	H	S	H_d	k	π
<i>A. italicus</i> Italy	20	4	8	0.671±0.066	3.730	0.0090±0.0006
<i>A. italicus</i> Iberian	191	5	4	0.121±0.032	0.162	0.0004±0.0001
Spain_indep_basins	33	3	2	0.392±0.087	0.405	0.0006±0.0015
Guadalquivir	46	6	6	0.245±0.084	0.344	0.0005±0.0002
Ebro (High+Low)	60	3	2	0.524±0.210	0.540	0.0008±0.0000
Duero	2	1	0	0.000	0.000	0.000
NSpain	7	1	0	0.000	0.000	0.0000
East Pyrenees	33	7	6	0.383±0.107	0.911	0.0014±0.0002
Sondrio	5	1	0	0.000	0.000	0.0000
Tíber	10	1	0	0.000	0.000	0.0000
Arno	5	2	4	0.667±0.204	2.667	0.0040±0.0012

n= número de individuos; h= número de haplotipos; S=número de sitios polimórficos; H_d = diversidad haplotípica; k= número promedio de sitios polimórficos; π = diversidad nucleotídica.

La mayoría de las comparaciones de Φ_{ST} entre poblaciones y grupos geográficos de *A. i. italicus* fueron no significativas (Tabla 3). Los valores de Φ_{ST} más altos y además significativos se observaron al comparar la población de Muga Salinas con la cuenca del Guadalquivir y las poblaciones del alto Ebro ($\Phi_{ST} = 0,976$ y $0,940$ respectivamente). Valores altos de Φ_{ST} se encontraron también entre las poblaciones italianas de *A. i. italicus* y las de las cuencas ibéricas.

1. Estructura mitocondrial de *Austropotambius italicus*

Tabla 3. Comparaciones de Φ_{ST} por pares entre grupos geográficos de *A. i. italicus*. En negritas se indican los valores significativos tras aplicar la corrección secuencial de Bonferroni [$P(i)=0.00028$] y aquellos subrayados indican valores significativos luego corregir por la tasa de falso descubrimiento [$P(i)=0.0097$]. Los valores negativos son debidos a la aplicación del algoritmo, y deben ser considerados como valores cero.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1. Arno																			
2. Guadajoz	0.806																		
3. Guadalfeo	0.720	0.000																	
4. Guadalquivir	0.921	-0.126	-0.314																
5. Guadiaro	0.755	0.111	-0.200	-0.052															
6. Guadalhorce	0.720	0.000	0.000	-0.314	-0.200														
7. Velez	0.720	0.000	0.000	-0.314	-0.200	0.000													
8. Segura	0.720	0.000	0.000	-0.314	-0.200	0.000	0.000												
9. High Ebro	0.857	0.195	0.081	0.316	0.194	0.081	0.081	0.081											
10. Low Ebro	0.927	0.539	0.485	0.427	0.540	0.485	0.485	0.485	<u>0.245</u>										
11. Mijares	0.792	0.333	0.111	0.150	0.200	0.111	0.111	0.111	0.068	-0.054									
12. Turia	<u>0.831</u>	0.314	0.143	0.182	0.250	0.143	0.143	0.143	0.112	-0.010	-0.263								
13. Nervion	0.636	1.000	1.000	0.522	0.500	1.000	1.000	1.000	-0.149	0.748	0.556	0.600							
14. Ercina	0.751	1.000	1.000	<u>0.752</u>	0.813	1.000	1.000	1.000	0.386	<u>0.853</u>	0.805	0.806	1.000						
15. Fluvia	<u>0.882</u>	-0.013	-0.191	0.076	0.089	-0.191	-0.191	-0.191	<u>0.297</u>	0.531	0.270	0.297	0.568	<u>0.784</u>					
16. Ter	0.720	0.000	0.000	-0.314	-0.200	0.000	0.000	0.000	0.081	0.485	0.111	0.143	1.000	1.000	-0.191				
17. Muga_al	<u>0.887</u>	-0.084	-0.276	0.012	0.114	-0.276	-0.276	-0.276	<u>0.289</u>	0.552	0.326	0.338	0.708	0.860	0.103	-0.276			
18. Muga_Sal	0.903	0.973	0.955	0.976	0.956	0.955	0.955	0.955	<u>0.940</u>	<u>0.980</u>	0.959	0.966	0.935	0.958	<u>0.973</u>	0.955	<u>0.979</u>		
19. Besos	<u>0.780</u>	0.493	0.335	0.634	0.410	0.335	0.335	0.335	0.393	<u>0.560</u>	0.302	0.373	0.333	0.607	<u>0.590</u>	0.335	<u>0.621</u>	0.926	
20. Sovara	<u>0.872</u>	<u>0.938</u>	0.914	0.928	0.907	0.914	0.914	0.914	0.847	0.947	<u>0.912</u>	<u>0.920</u>	0.902	0.926	<u>0.927</u>	0.914	<u>0.943</u>	0.966	<u>0.856</u>

El análisis de SAMOVA claramente separó las poblaciones de la Península Ibérica de las poblaciones italianas, como se observa en los valores más bajos de k . Sin embargo, el valor más alto de F_{CT} ($F_{CT} = 0,995$) se obtuvo del arreglo predefinido de las poblaciones en $k = 13$ grupos (Figura 4, tabla 1). Por lo general, se observa un gran grupo genético agrupando 52 localidades ibéricas, mientras que el resto de las localidades de la Península Ibérica se encuentran principalmente en 8 grupos individuales. Las muestras italianas se organizaron en cuatro grupos genéticos, uno de los cuales contiene siete localidades. Sólo un grupo genético agrupó a muestras ibéricas e italianas, que correspondió con el río Arroyo, del Guadalquivir, el cual se agrupó con los ríos Nirano y Papiano, de las cuencas de los ríos Po y Tíber (ver Tabla 1).

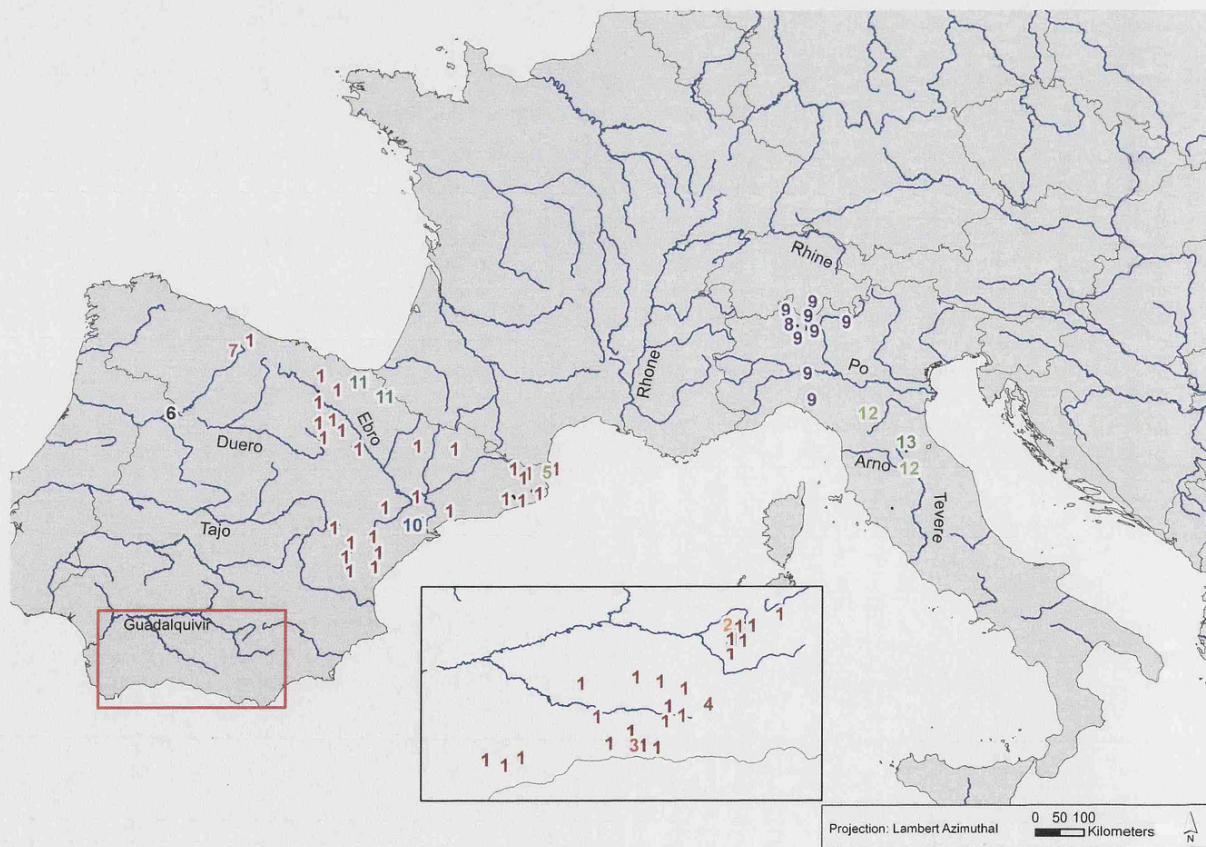


Figura 4. Mapa de las poblaciones de acuerdo a los grupos genéticamente homogéneos de *A. i. italicus* resultantes del análisis SAMOVA (para referencia a los números ver Tabla 1).

1.3.3 Análisis filogeográfico de clados anidados

La red de haplotipos basada en parsimonia proporcionada por TCS incluyendo el total de la información mitocondrial se utilizó para construir un diseño anidado (Figura 5), el cual estuvo estructurado en 13 clados de primer nivel, seis clados de segundo nivel y cuatro clados de tercer nivel. Todas las muestras ibéricas se agruparon en Clado 3-3, mientras que los haplotipos italianos se encontraron en los clados 3-1 y 3-2 (Tabla 4).

Tabla 4. Frecuencias de los haplotipos del NCA en cada cuenca hidrográfica. Ver tabla 1 para referencia a los códigos de los haplotipos y la designación de la cuenca a cada población.

<i>Region</i>	<i>I</i>	<i>II</i>	<i>III</i>	<i>IV</i>	<i>V</i>	<i>VI</i>	<i>VII</i>	<i>VIII</i>	<i>IX</i>	<i>X</i>	<i>XI</i>	<i>XII</i>	<i>XIII</i>	<i>XIV</i>	<i>XV</i>	<i>XVI</i>	<i>XVII</i>	<i>XVIII</i>	<i>XIX</i>	<i>XX</i>	<i>XXI</i>	<i>XXII</i>	<i>XXIII</i>
Guadajoz (ES)	6																						
Guadalquivir (ES)	42	1	1			1	1							1		2							
Velez (ES)	3																						
Segura (ES)	3																						
Guadalfeo (ES)	3																						
Guadiaro (ES)	5																						
Guadalupe (ES)	3																						
High Ebro (ES)	2			14	3							1			9	2							
Low Ebro (ES)	6															20							
Mijares (ES)	3															3							
Turía (ES)	2															4							
Northern Spain				2	4																		
Fluviá (ES)	10																		3				
Ter (ES)	3																						

1. Estructura mitocondrial de *Austropotamobius italicus*

Region	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV	XVI	XVII	XVIII	XIX	XX	XXI	XXII	XXIII
Besós (ES)	2							2	1		1												
Muga (ES)	10																				1	1	
Ebro (ES)(High+Low)	8			14	3							1			9	22							
Independen (ES) ^t	28					1										7							
East Pyrenees (ES)	25							2	1	3	1		1							1	1		
Arno (IT)																						1	1
Sovara (IT)																	1	2	2				
Total (196)	103	1	1	16	7	2	1	2	1	3	1	1	1	1	9	31	1	2	2	2	1	1	1

Nueve de los 20 clados con información geográfica y genética utilizados en Geodis, mostraron importantes asociaciones no aleatorias entre clados y localidades de muestreo (Tabla 5). Por ejemplo, los clados 2-5, 2-6 y 2-7 mostraron asociación geográfica significativa correspondiente a flujo genético restringido con aislamiento por distancia (Tabla 5).

Tabla 5. Inferencias soportadas por el análisis NCPA, tras la aplicación de la clave GeoDis (11 de Noviembre 2005). La cadena de inferencia y las conclusiones están indicadas.

Clade/haplotype	Chain of inference	χ^2	P	Demographic event inferred
X	1-2-3-5-6-7-8		0.004	Restricted gene flow/dispersal but with some long distance dispersal over intermediate areas not occupied by the species; or past gene flow followed by extinction of intermediate populations
XV	1-2-3-5-6-7-8		0.000	Restricted gene flow/dispersal but with some long distance dispersal over intermediate areas not occupied by the species; or past gene flow followed by extinction of intermediate populations
1-7	1-2-3-5-6-7-8	188.63	0.000	Restricted gene flow/dispersal but with some long distance dispersal over intermediate areas not occupied by the species; or past gene flow followed by extinction of intermediate populations
1-8	1-2-3-5-6-7-8	188.63	0.000	Restricted gene flow/dispersal but with some long distance dispersal over intermediate areas not occupied by the species; or past gene flow followed by extinction of intermediate populations
1-14	1-2-3-5-6-7-8	188.63	0.023	Restricted gene flow/dispersal but with some long distance dispersal over intermediate areas not occupied by the species; or past gene flow followed by extinction of intermediate populations
2-6	1-2-3-4 NO	205.7	0.026	Restricted gene flow with isolation by distance
2-7	1-2-3-4 NO	205.7	0.001	Restricted genetic flow with isolation by distance
Total Cladogram	1-19-20 NO	296	0.000	Inadequate geographic sampling

El clado 2-7 incluyó principalmente poblaciones del noreste de la Península Ibérica y los Pirineos y el clado 2-5 a las muestras de la cuenca del Guadalquivir, mientras que 6-2 clado incluyó casi toda la distribución geográfica de la especie en la Península Ibérica. Varios clados de un solo paso (1-7, 1-8, 1-14) mostraron una asociación significativa, todos ellos correspondientes a "flujo genético restringido/dispersión, pero con dispersión a larga distancia a través de zonas intermedias no ocupadas por la especie; o flujo genético anterior seguido por extinción de las poblaciones intermedias".

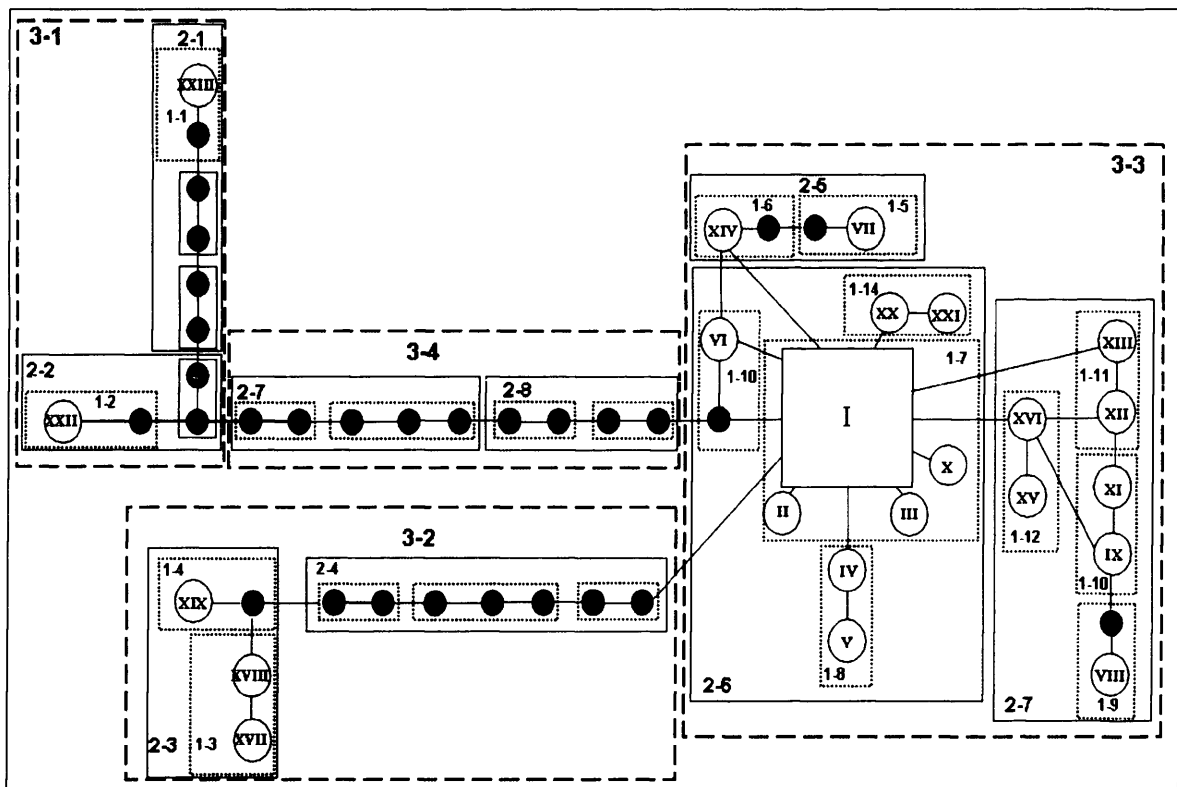


Figura 5. Red del análisis de parsimonia estadística mostrando el diseño anidado de los haplotipos correspondientes a las poblaciones ibéricas de *A. i. italicus* (95% de probabilidad). Fueron incluidas dos poblaciones de Italia, aunque el objetivo principal del NCA fue probar la hipótesis de la existencia de patrones geográficos asociados a la variación genética de las poblaciones ibéricas. Los círculos en gris representan haplotipos internos no detectados y cada línea una sustitución. La línea punteada define clados de primer nivel, los rectángulos clados de segundo y las líneas gruesas clados de tercer nivel.

1.3.4 Demografía y datación

Las pruebas de neutralidad aplicadas al conjunto de datos III mostraron una desviación significativa de la neutralidad en el caso del índice F de Fu = -11.27 ($P < 0.05$) y $R_2 = 0.0299$ ($P < 0.05$), a pesar de que las otras pruebas mostraron desviaciones no significativas del equilibrio. La D de Tajima (-1.34, 0.10) ($P > 0.05$) y la F de Fu y Li (-1.78, 0.10) ($P > 0.05$) fueron negativas, aunque no significativas, al igual que el valor de raggedness ($Hr = 0.064$) fue significativa. Esta incongruencia se puede explicar por el hecho de que las dos pruebas significativas están especialmente indicadas para detectar desviaciones debido a la expansión de la población. Las otras pruebas son propensas a ser influenciadas por el tamaño de muestreo y / o la presencia de haplotipos a baja frecuencia, por lo que tienen menor poder estadístico (Fu, 1997; Ramos-Onsins y Rozas, 2002).

Fue observada una distribución unimodal de mismatch, es esperable en poblaciones que han experimentado una expansión (Harpending, 1994, Rogers y Harpending, 1992), tanto en el caso de los dos fragmentos COI analizó como con la evidencia mitocondrial total en las poblaciones ibéricas de *A. i. italicus* (ver archivo complementario II). Considerando el intervalo de tasas de mutación del COI, el valor resultante de $\tau = 0.184$ para las muestras ibéricas sugiere una expansión resultante de una población inicial hace entre 16.871 y 10.772 años para las tasas de divergencia del 1,66% y 2,6%, y hace cerca de 20.004 años para una tasa de divergencia promedio de 1,4% PMY. Las corridas independientes utilizando IM convergieron en distribuciones marginales aproximadas de las probabilidades posteriores, obteniendo estimaciones fiables de θ_1 y θ_2 . Los resultados del análisis de IM se resumen en la

Figura 6. El tiempo transcurrido desde la divergencia ($t = T\mu$) escalado por la tasa de mutación (μ) se recuperó también con confianza, porque su distribución fue casi completa (aunque a veces fue no-cero) después del procedimiento de estabilización. El pico agudo en la distribución de probabilidad marginal posterior del parámetro del tiempo en la divergencia indica claramente una división reciente entre *A. i. italicus* de la Península Ibérica e Italia. Cuando t se convierte en una escala de años por tasa de mutación ($\mu = 0,7\%$ PMY, $t = 0,16$, ver Figura 6) corresponde a $T = 34.858$ años (los límites inferior y superior del intervalo de confianza del 95% son $20.261 - 1,50 \times 10^6$ años). La posición de los picos de las densidades marginales posteriores (Figura 6) para el parámetro θ fueron $\theta = 15.02$ ($9.6051 - 111.3293$, al 95% HPD) y 5.89 (2.4819 a 48.5091 , el 95% HPD) para las poblaciones ibérica e italiana, y $\theta_A = 8.2$ ($1,6922 - 141,7402$, el 95% HPD) para la población ancestral inferida. Esto corresponde a un tamaño de la población de 818.182 para $N1$ ($523.153 - 6,06 \times 10^6$, 95% HPD), 321.269 para $N2$ ($135.179 - 2,64 \times 10^6$, 95% HPD) y 469.613 para la población ancestral ($92.167 - 7,72 \times 10^6$, 95% HPD). Esto sugiere que las poblaciones actuales de la Península Ibérica tienen mayor tamaño efectivo de la población ancestral (lo que es congruente con los cambios en el tamaño de la población estimada por métodos de mismatch), y también son más grandes que los de la península italiana, si bien este resultado no fue corroborado por el análisis de BSP, y debe tomarse con precaución debido a la ausencia en el análisis de las dos poblaciones de *A. i. italicus* de Francia registradas en anteriores trabajos. A pesar de esto, en este trabajo se puede considerar que la posibilidad de intercambio de genes es muy baja, teniendo en cuenta que se trata de dos poblaciones aisladas y que como ha sido propuesto, probablemente se originaron por introducción (Grandjean *et al*, 2000; Souty-Grosset *et al*, 2006). Como se muestra mediante el análisis de rarefacción, los parámetros estimados de las poblaciones probablemente no

son fuertemente influenciados por el desigual esfuerzo de muestreo entre los grupos de Italia e ibéricos, principalmente debido a la alta proporción de haplotipos únicos de la Península Ibérica.

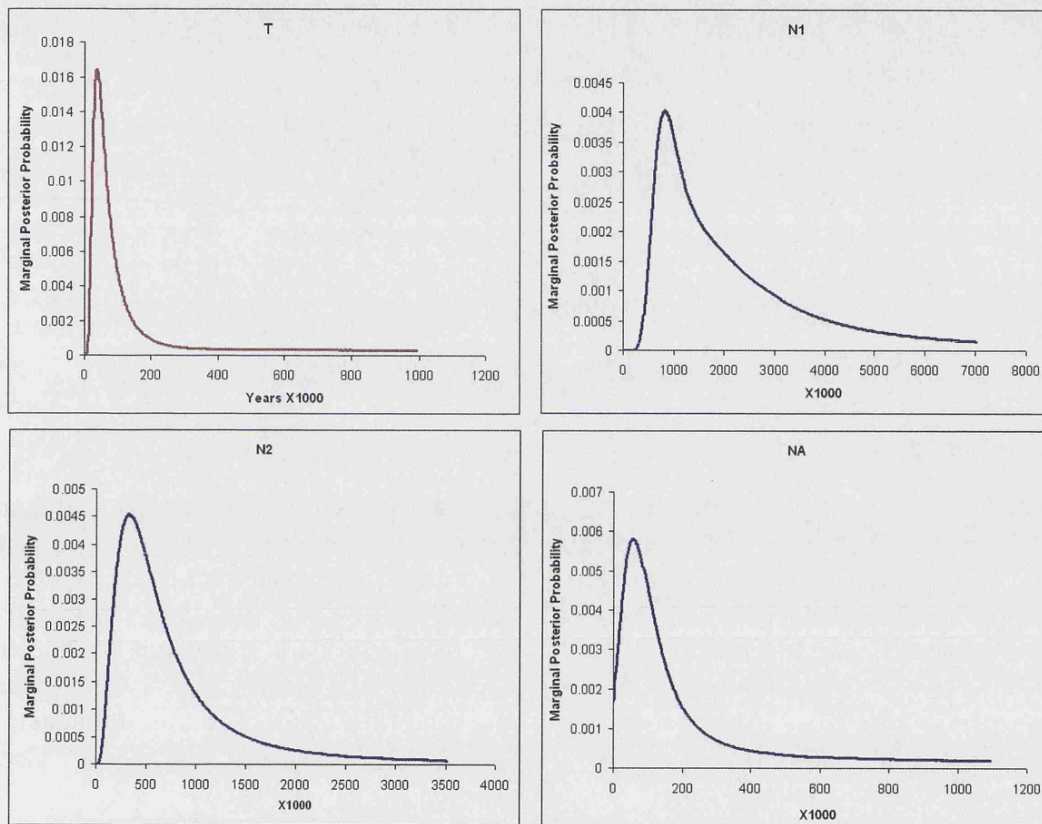


Figura 6. Densidades de probabilidad para los parámetros resultados del Modelo de aislamiento-migración. T se muestra en una escala de años a lo largo del intervalo correspondiendo a un valor máximo de t de 0.16. Se muestra N estimada ($N = \theta/4(\mu)$) para las poblaciones actuales de los grupos ibérico (N1), italiano (N2) y ancestral (NA). Cada curva está basada en los resultados de múltiples simulaciones por millones de pasos de Markov (ver Métodos), y es graficado en el intervalo del prior de cada parámetro, después del procedimiento de estandarización.

El tamaño efectivo de la población y las tendencias demográficas estimadas por el análisis BSP mostraron un patrón muy similar para la Península Ibérica y las muestras italianas. Sólo cuando se considera el conjunto completo de datos de muestras Ibéricas

(Figura 7A) se observaron valores ligeramente superiores de tamaños efectivos de población y un crecimiento de la población. Sin embargo, para los conjuntos de datos reducidos de la Ibérica, el tamaño y las tendencias de la población mostraron valores muy similares, además de una superposición de HPDs, con las muestras italiano.

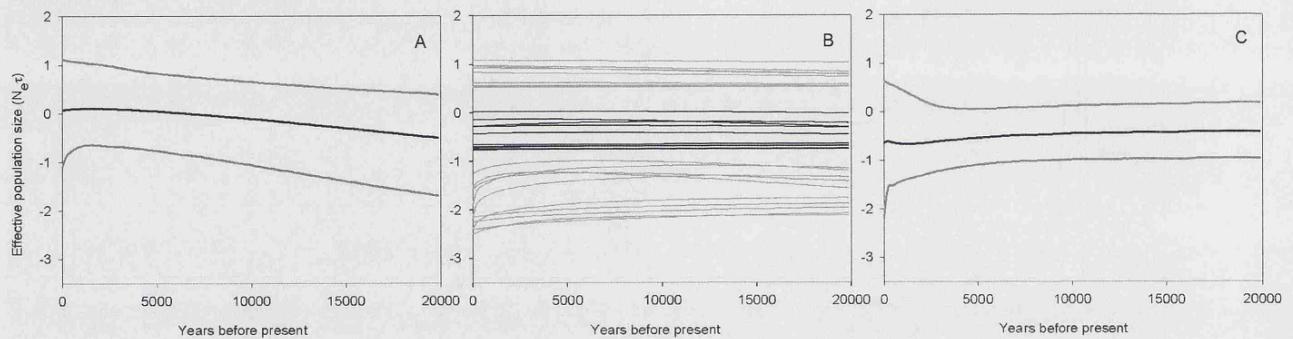


Figura 7. Análisis de “Bayesian Skyline Plot” de las poblaciones ibéricas (A) e italianas (B) de *A. i. italicus*, mostrando el tamaño efectivo en el tiempo asumiendo un modelo de evolución neutral. A, muestras ibéricas; B, BSP resultante de la estrategia de muestreo aleatorio (ver métodos) (de acuerdo al tamaño mínimo de las muestras italianas); C, BSP de las muestras italianas.

1.4 DISCUSIÓN

1.4.1 Relaciones filogenéticas

Este estudio representa el enfoque más integral de la filogenia del cangrejo de río en la Península Ibérica, ya que cubre la mayor parte de su intervalo de distribución en esta región. Las muestras de *A. italicus* utilizadas en este estudio fueron incluidas en dos clados principales (ver Figura 3). De acuerdo con el árbol filogenético, la mayoría de las muestras de la Península Ibérica pueden ser asignadas a *A. i. italicus* (Figura 3, Fratini *et al*, 2005; Grandjean y Souty Grosset, 2000) *Austropotamobius i. carinthiacus* es parafiletico, con *A. i. italicus* incluido en el mismo clado que ella, (en el clado I). El clado II estuvo integrado por muestras previamente asignadas a las subespecies *A. i. meridionalis* y *A. i. carsicus*. Sin embargo, ninguna estructura geográfica o subespecífica fue observada dentro de este clado. El hallazgo de una cierta concordancia entre la geografía y la estructura filogenética se ha utilizado previamente para apoyar las diferentes subespecies del Clado II. Los resultados de este estudio muestran que, aunque las dos subespecies son recíprocamente monofiléticas, están soportadas por valores muy bajos de bootstrap y de probabilidades posteriores. Esto podría sugerir que los estudios anteriores sólo han incluido una porción limitada de la variabilidad genética de *A. italicus* (Fratini *et al.*, 2005; Grandjean y Souty-Grosset, 2000). Es posible que la inclusión de un mayor número de individuos y poblaciones, y por lo tanto de mayor variación genética, haya completado información filogenética faltante y por lo tanto

mostrado que la diferenciación genética sub-específica no es tan clara como se ha asumido.

En general, los clados I y II podrían estar asociados a cierto grado de estructuración geográfica coherente con su distribución en Europa. Por lo tanto, el clado I se asocia principalmente con un componente de orientación occidental, incluyendo la parte Norte de los Apeninos, el oeste de los Alpes, Francia y la Península Ibérica, mientras que clado II tiene una distribución más oriental, que incluye el este de los Alpes, noreste de Italia y la los Alpes Dináricos. Ambos clados se solapan en un gran zona de "sutura" principalmente localizada a lo largo de la región alpina. La evidencia filogenética sugiere por lo tanto un escenario biogeográfico complejo y reciente, lo que daría lugar a complejas modificaciones pasadas en la distribución del género *Austropotamobius*. La incongruencia de la estructura genética con una regionalización general no debería considerarse como una consecuencia de la translocación mediada por el hombre, dado que cualquier conclusión debe ser tratada con especial precaución, especialmente cuando se basa en información genética escasa. Patrones de distribución disyuntivos e irregulares se observan con frecuencia en diferentes organismos en Europa como resultado del cambio climático, especialmente durante los periodos glaciales (Benke *et al* 2009; Schmitt *et al* 2006; Weiss *et al* 2002.), y la presencia de algunos haplotipos escasos y raros se puede explicar por procesos históricos como lo son relictos de intervalos de distribución más amplios en el pasado. Por ejemplo, la mayor diversidad de haplotipos en la subespecie *A. i. carsicus* y *A. i. carinthiacus* podría ser identificada con un patrón mixto de poblaciones relictas asociadas a la región de los Alpes, probablemente relacionado con microrefugios glaciales en el pasado, lo

que ha sido propuesto para otras regiones, como la península de Istria (Trontelj *et al.*, 2005).

La observación proveniente de estudios anteriores hechos con los fragmentos mitocondriales 16S rARN y COI de un solo haplotipo para todas las poblaciones ibéricas, no se soporta por este estudio. El gen 16S ARNr no mostró diferencias entre todos los *A. i. italicus* de España, probablemente debido a una menor tasa de variación para este marcador que para el COI, como se ha observado en estudios previos con esta especie y otros organismos (Trontelj *et al.*, 2005; Verovnik *et al.*, 2005; Zaccara *et al.*, 2004). El hallazgo de un linaje diferente proveniente del río Muga indica que la diversidad genética en la Península Ibérica no es desestimable cuando se considera el fragmento del 16S rARN. Esta observación podría apoyar una hipótesis alternativa, en la que la diversidad genética en la Península Ibérica no sería exclusivamente debido a la introducción mediada por el hombre (Fratini *et al.*, 2005; Grandjean *et al.*, 2000; Grandjean y Souty Grosset, 2000; Trontelj *et al.*, 2005). Como se ha encontrado en estudios comparativos con las poblaciones nativas e introducidas, la ausencia de diferenciación del ADN mitocondrial y de diversidad de haplotipos sería esperable si todas las poblaciones fueran resultado de un evento de introducción y a partir de un número muy reducido de poblaciones o incluso una sola población (Miura *et al.*, 2006; Uwai *et al.*, 2006). La evidencia de que dos líneas divergentes de distribuciones contrastantes se presentan en la Península Ibérica requiere que por lo menos dos eventos diferentes de introducción hayan tenido lugar, cada uno con una dinámica de dispersión diferentes posterior. Actualmente, no existe evidencia que sugiera que este escenario podría haber ocurrido por mecanismos naturales o artificiales. Sin embargo, no existe un argumento válido en favor de la hipótesis alternativa de que al menos dos

introducciones hayan determinado el patrón genético observado, porque existen procesos naturales biogeográficos que son posibles y que por lo tanto deberían ser considerados como alternativa.

1.4.2 Diversidad genética

A pesar de que la diversidad mitocondrial de las poblaciones ibéricas fue baja, ésta fue mayor que la reportado previamente (Grandjean *et al*, 2002a; Grandjean *et al*, 2001; Trontelj *et al*, 2005.). De hecho, varios valores de la nucleotídica observada en otras regiones provenientes de estudios anteriores con el complejo *A. italicus*, fueron similares a los obtenidos en este estudio para la Península Ibérica con el mismo fragmento COI ($\pi = 0.001$ y $\pi = 0,009$ para la Dalmacia y de los Alpes SE respectivamente) (Trontelj *et al.*, 2005). En concreto, este es el caso de clado I, que se caracteriza por los valores más bajos de diversidad genética de todas las poblaciones estudiadas hasta la fecha (Grandjean y Souty Grosset, 2000; Trontelj *et al*, 2005). La divergencia haplotípica es también mucho menor en este clado que en el clado II. La menor diversidad de *A. i. italicus* en la Península Ibérica también podría ser debido a la dramática reducción en el tamaño de la población desde la introducción de cangrejos exóticos como el cangrejo rojo (*Procambarus clarkii*) y el cangrejo señal (*Pascifastacus leniusculus*) (Gherardi y Holdich, 1999). Ambas especies son vectores de la plaga de la afanomicosis (Diéguez-Uribeondo *et al.*, 1997), que diezmó gran parte de las poblaciones restantes y, por tanto, podrían haber determinado la diversidad genética y la estructura que se encuentran hoy en día.

El Análisis de Clados Anidados asume un muestreo geográfico completo, lo que no se cumple en este estudio debido a la falta de poblaciones posiblemente localizadas en regiones intermedias de Francia (véase Grandjean *et al.* 2000) y posiblemente esta es la razón por la cual sólo las inferencias dentro de la Península Ibérica fueron significativas. La estructura representada por la red de parsimonia del clado I (Figura 5) muestra a un grupo de haplotipos bien definido correspondiente a las poblaciones ibéricas de *A. i. italicus* de diversidad muy reducida (clado 3-3). Estas poblaciones están conectadas a dos clados de muestras italianas (clados 3-1 y 3-2), que presumiblemente pertenecen a *A. i. carinthiacus* (Población 64) del río Arno y a *A. i. italicus* del río Tiber (Población 65). Las asociaciones geográficas entre los haplotipos de la Península Ibérica son coherentes con la presencia histórica de *A. i. italicus* en la región (Hewitt, 1999b). Lo más probable es que las asociaciones significativas de clados de un solo paso sean debidas al flujo genético restringido, a la luz de las limitaciones inherentes a la dispersión de agua dulce del cangrejo de río (Bubb *et al.*, 2008), lo que podría ser necesario para la dispersión a larga distancia. Sin embargo, no se puede descartar que este tipo de movimiento dentro de Iberia pudiera haber sido mediado por el hombre. El análisis de haplotipos mostró una riqueza de haplotipos relativamente alta en la Península Ibérica, y unas frecuencias haplotípicas muy diferentes entre estas poblaciones y las italianas (Tabla 1).

Se observaron dos haplotipos compartidos (haplotipos 10 y 21) entre las poblaciones italianas e ibéricas. Aunque estos haplotipos no mostraron una concordancia geográfica clara, algunos patrones pueden ser identificados, como la más alta diversidad de haplotipos en el NE de la Península Ibérica (Pirineos orientales y la cuenca del Ebro). Estas observaciones están de acuerdo con recientes hallazgos acerca

de la diversidad genética y haplotípica (Beroiz *et al*, 2008; Dieguez-Urbeondo *et al*, 2008) y contrastan con estudios previos que incluían un menor muestreo geográfico y genético de la Península Ibérica, en los que sólo se había encontrado un haplotipo mitocondrial (Grandjean *et al*, 2002a; Grandjean *et al*, 2001; Trontelj *et al*, 2005). Varios estudios han demostrado que es esperable que todos los haplotipos de las poblaciones introducidas estén representados en el área de distribución natural de la especie, la cual en general presenta niveles más altos de diversidad y de tamaño efectivo de la población (Miura *et al*, 2006; Uwai *et al*, 2006). Esto no es, sin embargo, el caso de *A. i. italicus* de la Península Ibérica, en la que se encontraron 15 haplotipos exclusivos de COI. Además, las estimaciones de los tamaños efectivos de la población, una medida relativa de la diversidad genética, fueron similares para las poblaciones ibéricas y las italianas, así como su historia demográfica. A pesar de tener una riqueza de haplotípica alta, las poblaciones ibéricas muestran valores bajos de diversidad nucleotídica, que se asocia frecuentemente a los eventos recientes de diversificación y de expansión de una población después de un período de disminuciones en el tamaño efectivo causado por cuellos de botella o un efecto fundador (Slatkin y Hudson, 1991). Estos patrones, de nuevo, dan evidencias para rechazar o aceptar la hipótesis de origen natural para esta especie en la Península Ibérica.

1.4.3 Filogeografía y patrones históricos

En diferentes estudios se ha demostrado que los factores históricos afectan la forma y distribución de las especies (Hewitt, 2004). En algunos casos, patrones filogeográficos complejos pueden ser difíciles de explicar y no siempre son coincidentes con los observados por otros organismos. Esto podría ser debido a que representan

grupos que en el pasado tuvieron una distribución más amplia de haplotipos que no prosiguieron con una dinámica invasiva luego de los episodios glaciares (Gómez-Zurita y Vogler, 2003; Lenk *et al*, 1999; Schmitt, 2007). Se han propuesto patrones que incluyen el traspaso de las actuales barreras geográficas para explicar la distribución geográfica compleja de haplotipos, como en el caso de *Cottus gobio*, una especie de pez habitantes de cabeceras de río ampliamente distribuidos en el centro de Europa, cuya distribución actual en gran parte se explica por los eventos recientes relacionados con los ciclos consecutivos de retroceso de los glaciares y cuya colonización de la cuenca del Rin suizo se produjo recientemente, después del Younger Dryas, alrededor de 6600 años atrás (Neuenschwander *et al.*, 2008).

Como ya se ha propuesto para el cangrejo de río, es probable que factores climáticos recientes tales como los cambios del nivel del mar y los ciclos glaciares de expansión-retiro hayan jugado un papel central en la diversificación y distribución de la especie (Dieguez-Urbeondo *et al*, 2008.; Fratini *et al*, 2005;. Santucci *et al*, 1997). En consecuencia, es posible que similarmente a otras especies de agua dulce, los patrones actuales de distribución hayan sido muy influenciados por la formación de refugios del Pleistoceno (Schmitt, 2007), desde los cuales una posterior dispersión y reinvasión podría tener lugar, según lo propuesto por el modelo de expansión-contracción (Hewitt, 1996; Provan y Bennett, 2008). Además, la diferenciación mitocondrial de las poblaciones ibéricas fue soportada por los análisis de Φ_{ST} y SAMOVA, lo que indica claramente una estructura genética entre la Península Ibérica e Italia, y sería coherente con que estas poblaciones podrían tener un origen natural. Dentro de la Península Ibérica, la mayoría de las poblaciones parecen constituir un grupo genético, lo que

sugiere o una baja diferenciación o un flujo genético alto, ya sea por medios naturales o mediados por el hombre.

La variación genética en las poblaciones ibéricas de *A. i. italicus* también podría estar relacionado con las respuestas demográficas al retiro y la recuperación durante y después de la último máximo glacial (LGM). Teniendo en cuenta la primera hipótesis propuesta por Karaman (Karaman, 1962) y respaldada por Santucci *et al.*, (1997) y Dieguez-Urbeondo *et al.*, (2008), es posible que la subespecie *A. i. italicus* haya habitado un área de distribución única, que iría desde el este de la Península Ibérica hasta por lo menos los Apeninos centrales. Este intervalo de distribución debería estar presente antes de la LGM, hace alrededor de 30.000 años (Hewitt, 2004). De acuerdo con los resultados obtenidos del análisis de IM, la separación podría haber tenido lugar durante el LGM temprano ($T = 34.858$ años, 90% HPD = $20,261-1.501 \times 10^6$ años), cuando tuvo lugar no sólo una disminución de las temperaturas en el norte de Europa, sino, y lo que es probablemente más importante para organismos de agua dulce, también un proceso de desecación importante en la mayor parte del territorio entre los Pirineos y los Alpes (Peyron *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 2007). Es posible que este proceso haya podido separar la historia de la población de ambos intervalos, en la Península Ibérica e Italia. Después del LGM, la población ibérica podría haber sido fuertemente reducida a tan sólo unas pocas poblaciones, que ampliaron su área de distribución geográfica para el resto de la Península, hace alrededor de 10,772-20,004 años, según lo sugerido por el tiempo transcurrido desde la expansión estimada por el análisis coalescente de mismatch (Material Complementario II). Sin embargo, es probable que esta expansión en la distribución no se acompañó necesariamente de un aumento en el tamaño efectivo

de la población, ni en la Península Ibérica o ni en Italia, según lo indicado por el BSP (Figura 7).

Estas fechas son coherentes también con los tiempos estimados para la división del pino negro *Pinus nigra*, que habita en los Pirineos y el sur de Francia, justo antes de la LGM, posiblemente a consecuencia de un aumento en la tasa de desecación en la región oriental de los Pirineos (Afzal-Rafii y Dodd, 2007). Considerando las características de dispersión de la especie, sin embargo, parece difícil que *A. i. italicus* haya llegado a casi todas las cuencas fluviales de la Península Ibérica (Bubb *et al.*, 2008). Por otra parte, teniendo en cuenta que el primer registro histórico claro de la especie data del siglo XVIII (Alonso, 2004), es posible que, al igual que muchas otras especies de interés económico y para la conservación, los movimientos mediados por el hombre hayan desempeñado un papel importante en su distribución actual en la Península Ibérica (Muñoz, 1967), y que esto pueda estar relacionado con la poca diferenciación genética observada entre las localidades. También se ha propuesto que los patrones glaciales han dado forma a la distribución de *A. italicus* en las penínsulas italiana y de Istria, donde la distribución de los haplotipo a veces muestran patrones irregulares y discontinuos (Trontelj *et al.*, 2005). Similarmente, varias especies muestran distribuciones actuales entre las Penínsulas Ibérica e Italiana, principalmente debido a los procesos glaciares, cuyas distribuciones han requerido de explicaciones complejas y poco usuales. Existen varios ejemplos de poblaciones o haplotipos con distribuciones similares pero genéticamente muy cercanos, como lo son las poblaciones del género *Salamandra* conformadas por *S. s. bernardezi*, del norte de España y *S. s. giglioli* del sur de Italia (Steinfartz *et al.*, 2000.); varias especies de mariposas de montaña en los Pirineos y el suroeste de los Alpes (Schmitt *et al.*, 2006), el grillo

Ephippiger ephippiger distribuido en los Pirineos y los Alpes (Spooner y Ritchie, 2006) ; el rebeco *Rupicapra pyrenaica* (Masini y Lovari, 1988) con poblaciones distribuidas en los Pirineos y el sur de Italia, la liebre europea *Lepus castroviejo* y *L. corsicanus* (Alves *et al*, 2008), dos subespecies muy cercanas que ocurren en el norte de España y el sur de Italia, e incluso especies de plantas como el roble pubescente *Quercus pubescens*, que se encuentra en el centro de los Apeninos y el sur de Francia, llegando a los Pirineos (Petit *et al*, 2003). Varias hipótesis se han propuesto para explicar la situación geográfica de grupos tan estrechamente relacionados, incluyendo un tiempo muy reciente de separación durante el período glacial Würm y dinámicas de dispersión post-glacial diferenciales entre linajes distintos, lo que podría haber llevado a los patrones complejos que observamos hoy en día. Las introducciones humanas no deberían de ser la única explicación considerada ante patrones recientes y complejos como los observados puedan estar detrás de patrones de distribución poco habituales. Los resultados de este estudio sugieren que la variación genética en los taxones que representan estos patrones deben ser revisados, antes de asumir alternativas de dispersión mediadas por el hombre como la única explicación para su distribución.

La evidencia mitocondrial presentada aquí proporciona nuevos argumentos para considerar un posible origen natural de las poblaciones ibéricas de *A. italicus* a consecuencia de una compleja historia biogeográfica y demográfica, seguida de una historia reciente influida por una combinación de procesos naturales y mediados por el hombre, dando como resultado la su estructura genética actual. Estudios futuros podrían incluir un esfuerzo de muestreo más exhaustivo de Italia y considerar la variación nuclear utilizando múltiples loci para ayudar a definir los tiempos y mecanismos subyacentes a la biogeografía de esta subespecie.

AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer a todos los involucrados en la aportación de muestras: Empresa de Gestión del Medio Ambiental, SA (EGMASA), en especial a Javier Galindo, Borja Nebot y todo su equipo; Parque Natural Garrotxa-Generalitat de Catalunya, especialmente a Joan Montserrat y Fina Torres; Sociedad de Desarrollo Medioambiental de Aragón (SODEMASA), Sección de Turismo, Medio Ambiente y Política Territorial del Gobierno de La Rioja; Conselleria de Territori i Habitatge de la Comunitat Valenciana; Carlos Nores proporcionó muestras del Lago Enol; Sección de Caza y Pesca de la Diputación Foral de Álava. Las muestras de quelopodios de individuos de Italia fueron proporcionadas con la colaboración de Stefano Pocellotti, Cessare Puzzi y UPS - Unione Pescatori Sportivi (Sondrio, Italia). Este capítulo fue mejorado en gran medida por fructíferas conversaciones con Patricia Ornelas García, quien también proporcionó ayuda durante la recogida de muestras y la edición. Un agradecimiento a Paul Bloor, que aportó sugerencias muy útiles, Silvia Perea, que brindó ayuda en el trabajo de campo y Beatriz Prieto con el manejo de SIG. CPL ha llevado a cabo este trabajo con el apoyo de una beca predoctoral del programa I3P del Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Este trabajo fue financiado parcialmente por EGMASA.

REFERENCIAS

- Afzal-Rafii, Z., Dodd, R.S., 2007. Chloroplast DNA supports a hypothesis of glacial refugia over postglacial recolonization in disjunct populations of black pine (*Pinus nigra*) in western Europe. *Mol. Ecol.* 16, 723-736.
- Alonso, F., 2004. Dinámica de las poblaciones del cangrejo de río *Austropotamobius pallipes* (Faxon, 1914) en el sistema ibérico: aplicaciones a la recuperación de la especie. . Universidad Politécnica de Madrid, Spain, Madrid, Spain.
- Alves, P.C., Melo-Ferreira, J., Branco, M., Suchentrunk, F., Ferrand, N., Harris, D.J., 2008. Evidence for genetic similarity of two allopatric European hares (*Lepus corsicanus* and *L. castroviejo*) inferred from nuclear DNA sequences. *Mol. Phylogen. Evol.* 46, 1191-1197.
- Beroiz, B., Callejas, C., Alonso, F., Ochando, M.D., 2008. Genetic structure of Spanish white-clawed crayfish (*Austropotamobius pallipes*) populations as determined by RAPD analysis: reasons for optimism. *Aquat. Conserv.: Mar. Freshwat. Ecosyst.* 18.
- Bott, R., 1950. Die Flusskrebse Europas. *Abhandlungen der Senckenbergischen Naturforschenden Gesellschaft* 483, 1-36.
- Bubb, D.H., Thom, T.J., Lucas, M.C., 2008. Spatial ecology of the white-clawed crayfish in an upland stream and implications for the conservation of this endangered species. *Aquat. Conserv.: Mar. Freshwat. Ecosyst.* 18, 647-657.
- Buhay, J.E., 2009. COI-like" Sequences are Becoming Problematic in Molecular Systematic and DNA Barcoding Studies. *Journal of Crustacean Biology* 29, 96-110.
- Clement, M., Posada, D., Crandall, K.A., 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Mol. Ecol.* 9, 1657-1659.
- Colwell, R.K., 2009. EstimateS: Statistical estimation of species richness and shared species from samples. Version 8.2. User's Guide and application published at: <http://purl.oclc.org/estimates>.
- Cook, B., Pringle, C., Hughes, J., 2008. Phylogeography of an island endemic, the Puerto Rican freshwater crab (*Epilobocera sinuatifrons*). *Journal of Heredity*.
- Crandall, K.A., Fitzpatrick Jr, J.F., 1996. Crayfish molecular systematics: using a combination of procedures to estimate phylogeny. *Syst. Biol.* 45, 1.
- Chao, A., 1987. Estimating the Population Size for Capture-Recapture Data with Unequal Catchability. *Biometrics* 43, 783-791.

- Dieguez-Urbeondo, J., Royo, F., Souty-Grosset, C., Ropiquet, A., Grandjean, F., 2008. Low genetic variability of the white-clawed crayfish in the Iberian Peninsula: its origin and management implications. *Aquat. Conserv.: Mar. Freshwat. Ecosyst.* 18.
- Diéguez-Urbeondo, J., Temino, C., Muzquiz, J.L., 1997. The crayfish plague fungus (*Aphanomyces astaci*) in Spain. *Bull. Fr. Peche Piscic.* 70, 753-763.
- Drummond, A., Rambaut, A., 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol. Biol.* 7, 214.
- Dupanloup, I., Schneider, S., Excoffier, L., 2002. A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Mol. Ecol.* 11, 2571-2581.
- Fratini, S., Zaccara, S., Barbaresi, S., Grandjean, F., Souty-Grosset, C., Crosa, G., Gherardi, F., 2005. Phylogeography of the threatened crayfish (genus *Austropotamobius*) in Italy: implications for its taxonomy and conservation. *Heredity* 94, 108-118.
- Fu, Y.X., 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147, 915-925.
- Fu, Y.X., Li, W.H., 1993. Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics* 133, 693-709.
- Gherardi, F., Holdich, D.M., 1999. Crayfish in Europe as alien species: how to make the best of a bad situation? A.A. Balkema, Rotterdam.
- Gopurenko, D., Hughes, J.M., Keenan, C.P., 1999. Mitochondrial DNA evidence for rapid colonisation of the Indo-West Pacific by the mudcrab *Scylla serrata*. *Mar. Biol.* 134, 227-233.
- Grandjean, F., Bouchon, D., Souty-Grosset, C., 2002a. Systematics of the European endangered crayfish species *Austropotamobius pallipes* (Decapoda: Astacidae) with a re-examination of the status of *Austropotamobius berndhauseri*. *Journal of Crustacean Biology*, 677-681.
- Grandjean, F., Frelond-Raimond, M., Souty-Grosset, C., 2002b. Compilation of molecular data for the phylogeny of the genus *Austropotamobius*: one species or several? *Bull. Fr. Peche Piscic.* 367, 671-680.
- Grandjean, F., Harris, D.J., Souty-Grosset, C., Crandall, K.A., 2000. Systematics of the European endangered crayfish species *Austropotamobius pallipes* (Decapoda: Astacidae). *Journal of Crustacean Biology* 20, 522-529.

- Grandjean, F., Souty-Grosset, C., 2000. Mitochondrial DNA variation and population genetic structure of the white-clawed crayfish, *Austropotamobius pallipes pallipes*. *Conserv. Genet.* 1, 309-319.
- Guindon, S., Gascuel, O., 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst. Biol.* 52, 696.
- Harpending, H.C., 1994. Signature of Ancient Population-Growth in a Low-Resolution Mitochondrial-DNA Mismatch Distribution. *Human Biology* 66, 591-600.
- Harpending, H.C., Sherry, S.T., Rogers, A.R., Stoneking, M., 1993. The genetic structure of ancient human populations. *Current Anthropology* 34, 483.
- Hasegawa, M., Kishino, H., Yano, T., 1985. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J. Mol. Evol.* 22, 160-174.
- Hewitt, G.M., 1996. Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biol. J. Linn. Soc.* 58, 247-276.
- Hewitt, G.M., 1999. Post-glacial re-colonization of European biota. *Biol. J. Linn. Soc.* 68, 87-112.
- Hewitt, G.M., 2004. Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 359, 183-195.
- Hey, J., 2005. On the number of New World founders: a population genetic portrait of the peopling of the Americas. *PLoS Biol* 3, e193.
- Hobbs, H.H.I., 1991. Decapoda. In: Thorp JH, AP, C. (Eds.), Ecology and classification of North American Freshwater Invertebrates. Academic Press, San Diego, California, pp. 823-858.
- Huelsenbeck, J.P., Ronquist, F., 2005. Bayesian analysis of molecular evolution using MrBayes. *Statistical methods in molecular evolution. New York: Springer*, 183–232.
- Kadereit, J.W., Griebeler, E.M., Comes, H.P., 2004. Quaternary diversification in European alpine plants: pattern and process. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 359, 265.
- Karaman, M., 1963. Studie del Astacidae. *Hydrobiologia* 22, 111-132.
- Karaman, M.S., 1962. Ein beitrag zur Systematik Astacidae (Decapoda). *Crustaceana* 3, 173-191.
- Klicka, J., Zink, R.M., 1997. The importance of recent ice ages in speciation: a failed paradigm. *Science* 277, 1666.

- Klicka, J., Zink, R.M., 1999. Pleistocene effects on North American songbird evolution. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 266, 695.
- Knowlton, N., Weigt, L.A., 1998. New dates and new rates for divergence across the Isthmus of Panama. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 265, 2257-2263.
- Knowlton, N., Weigt, L.A., Solorzano, L.A., Mills, D.K., Bermingham, E., 1993. Divergence in proteins, mitochondrial DNA, and reproductive compatibility across the Isthmus of Panama. *Science* 260, 1629.
- Lereboullet, A., 1858. Description de deux espèces d'écrevisses de nos rivières. *Mém. Soc. Sci. Nat. Strasbourg* 5, 11p. + 13 pl.
- Librado, P., Rozas, J., 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25, 1451.
- Masini, F., Lovari, S., 1988. Systematics, phylogenetic relationships, and dispersal of the chamois (*Rupicapra spp.*). *Quatern. Res.* 30, 339-349.
- Miura, O., Torchin, M.E., Kuris, A.M., Hechinger, R.F., Chiba, S., 2006. Introduced cryptic species of parasites exhibit different invasion pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 19818.
- Muñoz, G., 1967. Parque Nacional de la Montaña de Covadonga. In: S.N.P.F.C. (Ed.), Madrid, Spain.
- Neuenschwander, S., Largiader, C.R., Ray, N., Currat, M., Vonlanthen, P., Excoffier, L., 2008. Colonization history of the Swiss Rhine basin by the bullhead (*Cottus gobio*): inference under a Bayesian spatially explicit framework. *Mol. Ecol.* 17, 757-772.
- Nielsen, R., Wakeley, J., 2001. Distinguishing migration from isolation: a Markov chain Monte Carlo approach. *Genetics* 158, 885.
- Panchal, M., Beaumont, M.A., 2007. The automation and evaluation of nested clade phylogeographic analysis. *61* 6.
- Petit, R.J., 2008. On the falsifiability of the nested clade phylogeographic analysis method. *Mol. Ecol.* 17, 1404-1404.
- Petit, R.J., Aguinalalde, I., de Beaulieu, J.L., Bittkau, C., Brewer, S., Cheddadi, R., Ennos, R., Fineschi, S., Grivet, D., Lascoux, M., 2003. Glacial refugia: hotspots but not melting pots of genetic diversity. *Science* 300, 1563.

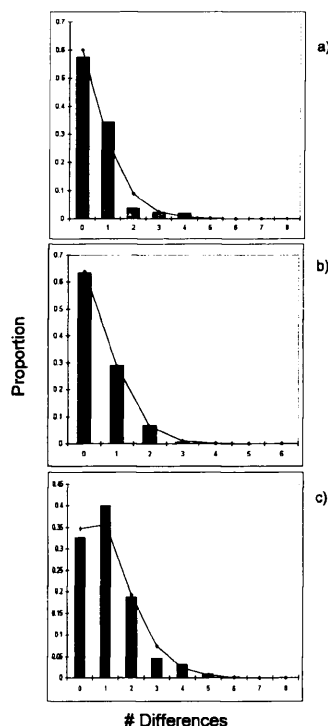
- Peyron, O., Guiot, J., Cheddadi, R., Tarasov, P., Reille, M., de Beaulieu, J.L., Bottema, S., Andrieu, V., 1998. Climatic reconstruction in Europe for 18,000 yr BP from pollen data. *Quatern. Res.* 49, 183-196.
- Posada, D., 2008. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Mol. Biol. Evol.* 25, 1253.
- Posada, D., Crandall, K.A., Templeton, A.R., 2000. GeoDis: a program for the cladistic nested analysis of the geographical distribution of genetic haplotypes. *Mol. Ecol.* 9, 487-488.
- Provan, J., Bennett, K.D., 2008. Phylogeographic insights into cryptic glacial refugia. *Trends Ecol. Evol.* 23, 564-571.
- Rambaut, A., Drummond, A.J., 2007. Tracer v1.4, Available from: <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>.
- Ramos-Onsins, S.E., Rozas, J., 2002. Statistical Properties of New Neutrality Tests Against Population Growth. *Mol Biol Evol* 19, 2092-2100.
- Rogers, A.R., Harpending, H., 1992. Population-Growth Makes Waves in the Distribution of Pairwise Genetic-Differences. *Mol. Biol. Evol.* 9, 552-569.
- Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P., 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19, 1572.
- Sanbrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Laboratory, New York.
- Santucci, F., Iaconelli, M., Andreani, P., 1997. Allozyme diversity of European freshwater crayfish of the genus *Austropotamobius*. *Bull. Fr. Peche Piscic.* 347, 663-676.
- Schmitt, T., 2007. Molecular biogeography of Europe: Pleistocene cycles and postglacial trends. *Frontiers in Zoology* 4, 1742-9994.
- Schmitt, T., Hewitt, G.M., Muller, P., 2006. Disjunct distributions during glacial and interglacial periods in mountain butterflies: *Erebia epiphron* as an example. *J. Evol. Biol.* 19, 108.
- Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H., Flook, P., 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 87, 651-701.
- Slatkin, M., Hudson, R.R., 1991. Pairwise Comparisons of Mitochondrial DNA Sequences in Stable and Exponentially Growing Populations. *Genetics* 129, 555-562.

- Souty-Grosset, C., Holdich, D.M., Noël, P.Y., Reynolds, J.D., Haffner, P., 2006. Atlas of Crayfish in Europe. Museum national d'Histoire naturelle, Paris.
- Spooner, L.J., Ritchie, M.G., 2006. An unusual phylogeography in the bushcricket *Ephippiger ephippiger* from Southern France. *Heredity* 97, 398-408.
- Starobogatov, Y.I., 1995. Taxonomy and geographical distribution of crayfishes of Asia and East Europe (Crustacea, Decapoda, Astacoidea) *Arthropoda Selecta* 4, 3-25.
- Steinfartz, S., Veith, M., Tautz, D., 2000. Mitochondrial sequence analysis of *Salamandra* taxa suggests old splits of major lineages and postglacial recolonizations of Central Europe from distinct source populations of *Salamandra salamandra*. *Mol. Ecol.* 9, 397-410.
- Tajima, F., 1989. Statistical-Method for Testing the Neutral Mutation Hypothesis by DNA Polymorphism. *Genetics* 123, 585-595.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24, 1596.
- Taylor, C.A., Hardman, M., 2002. Phylogenetics of the crayfish subgenus *Crockerinus*, genus *Orconectes* (Decapoda: Cambaridae), based on cytochrome oxidase I. *Journal of Crustacean Biology* 22, 874-881.
- Templeton, A.R., 1998. Nested clade analyses of phylogeographic data: testing hypotheses about gene flow and population history. *Mol. Ecol.* 7, 381-397.
- Templeton, A.R., 2001. Using phylogeographic analyses of gene trees to test species status and processes. *Mol. Ecol.* 10, 779-791.
- Templeton, A.R., 2004. Statistical phylogeography: methods of evaluating and minimizing inference errors. *Mol. Ecol.* 13, 789-809.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673.
- Trontelj, P., Machino, Y., Sket, B., 2005. Phylogenetic and phylogeographic relationships in the crayfish genus *Austropotamobius* inferred from mitochondrial COI gene sequences. *Mol. Phylogen. Evol.* 34, 212-226.
- Uwai, S., Nelson, W., Neill, K., Wang, W.D., Aguilar-Rosas, L.E., Boo, S.M., Kitayama, T., Kawai, H., 2006. Genetic diversity in *Undaria pinnatifida* (Laminariales, Phaeophyceae) deduced from mitochondria genes-origins and succession of introduced populations. *Phycologia* 45, 687-695.

- Weir, J.T., 2006. Divergent timing and patterns of species accumulation in lowland and highland neotropical birds. *Evolution* 60, 842-855.
- Won, Y.J., Hey, J., 2005. Divergence population genetics of chimpanzees. *Mol Biol Evol* 22, 297-307.
- Won, Y.J., Sivasundar, A., Wang, Y., Hey, J., 2005. On the origin of Lake Malawi cichlid species: a population genetic analysis of divergence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 Suppl 1, 6581-6586.
- Wu, H., Guiot, J., Brewer, S., Guo, Z., 2007. Climatic changes in Eurasia and Africa at the last glacial maximum and mid-Holocene: reconstruction from pollen data using inverse vegetation modelling. *Climate Dynamics* 29, 211-229.
- Zaccara, S., Stefani, F., Galli, P., Nardi, P.A., Crosa, G., 2004. Taxonomic implications in conservation management of white-clawed crayfish (*Austropotamobius pallipes*)(Decapoda, Astacidae) in Northern Italy. *Biol. Conserv.* 120, 1-10.

MATERIAL SUPLEMENTARIO

Material suplementario I.



Análisis de mismatch de los fragmentos del COI 5'y 3' y del conjunto de datos mitocondriales (a, b y c respectivamente).

•••••

Capítulo 2

**Aislamiento y caracterización de nuevos
loci microsatélites para el cangrejo de
río Europeo *Austropotamobius italicus*
(Faxon, 1914).**

2.1 RESUMEN

El cangrejo de río europeo *Austropotamobius italicus* (Faxon, 1914) ha experimentado un importante descenso a lo largo de su distribución especialmente en las poblaciones del oeste de Europa sobre , que han quedado limitadas a las cabeceras de algunos ríos. Los marcadores microsatélites son útiles para detectar con precisión y describir las diferencias genéticas entre las poblaciones de esta especie. Doce loci microsatélites se describen para *Austropotamobius italicus*. Estos loci fueron aislados a partir de bibliotecas genómicas parciales que enriquecidas para las repeticiones ACAG, AGAT, AAAG, AAG, GAT, la TC y CA. Los loci mostraron niveles moderados de polimorfismo ($H_O = 0,44 \pm 0.25$). Tres loci fueron amplificados con éxito en otras especies de cangrejos de río. Estos marcadores son útiles para estudiar el mantenimiento de la población, el flujo genético y la migración entre las poblaciones de esta especie.

2.2 AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN

El cangrejo de río *Austropotamobius italicus* (Faxon, 1914) ha experimentado un importante descenso a lo largo de su distribución a las poblaciones del oeste de Europa sobre todo limita a las cabeceras. Los marcadores microsatélites son necesarios para detectar con precisión y describir las diferencias genéticas entre las poblaciones de esta especie. Doce loci microsatélites se describen para *Austropotamobius italicus*. Loci fueron aisladas de bibliotecas genómicas parciales que se habían enriquecido para ACAG, AGAT, AAAG, AAG, GAT, la TC y la secuencia de repetición de CA. Loci mostraron niveles moderados de polimorfismo ($H_O = 0,44 \pm 0,25$). Tres loci fueron

amplificados con éxito en otras especies de cangrejos de río. Estos marcadores se utilizan para estudiar el mantenimiento de la población, el flujo de genes y la migración entre las poblaciones de esta especie.

El cangrejo de río *Austropotamobius italicus* (Faxon, 1914) es una especie amenazada (bajo la categoría de vulnerable de acuerdo a la IUCN), endémica de Europa, donde se encuentra desde la península de los Balcanes a España y Portugal. Una dramática disminución en su distribución ha tenido lugar durante los últimos 25 años, de forma que actualmente se limita en gran medida a las cabeceras de algunos ríos. Esta disminución se cree que ha sido mediada por las actividades humanas (que incluyen por ejemplo, la introducción de la plaga del cangrejo de río y la modificación del hábitat) (Diéguez-Urbeondo *et al.*, 1997). Cuatro subespecies han sido propuestas con base en la variación del ADN mitocondrial (ADNmt) (Fratini *et al.*, 2005), de forma que las poblaciones de la península Ibérica han sido asignadas a *Austropotamobius italicus italicus* y algunas de la de la Península Italiana, principalmente de la parte central y norte de los Apeninos. Mientras que los intentos para determinar la composición genética de las poblaciones mediante secuencias del ADNmt han identificado una importante estructuración geográfica, una comprensión más completa del mantenimiento de las poblaciones, el flujo genético y la migración entre las mismas se ha visto obstaculizada por las tasas de fijación relativamente lentas de este marcador. Los marcadores alta riqueza alélicas, como los loci microsatélites, tienen una gran capacidad para detectar y describir las diferencias genéticas entre las poblaciones a mucho menor escala geográfica y temporal de las que tradicionalmente ha sido posible con el uso de ADNmt (Queller *et al.* 1993). Los marcadores microsatélites se han utilizado previamente para detectar y describir las diferencias genéticas entre

poblaciones de otros miembros del género (Gouin *et al.*, 2006; Gouin *et al.*, 2002), pero hasta la fecha sólo una pequeña cantidad de loci se han amplificado con éxito en *A. italicus*. Por lo tanto, más marcadores microsatélites son necesarios para detectar con precisión y describir las diferencias genéticas entre las poblaciones de esta especie. En este estudio se presenta el aislamiento y caracterización de 12 loci microsatélites polimórficos de la subespecie *A. i. italicus*, y una prueba de amplificación en especies de cangrejos de río de otras siete especies.

Se construyeron bibliotecas genómicas parciales enriquecidas para repeticiones de microsatélites siguiendo el protocolo de Gardner *et al.* (1999), con algunas modificaciones. El ADN genómico fue extraído del tejido muscular del quelípedo de un solo individuo (proveniente de Coto Ríos, Provincia de Jaén, cuenca del río Guadalquivir, España) usando un protocolo estándar de proteinasa K y extracción con fenol-alcohol-isoamílico diclorometano y posterior precipitación con etanol (Sambrook *et al.*., 1989). No habiendo sido exitosos los primeros intentos de digerir el ADN genómico, el ADN genómico fue corrido en un gel de agarosa y purificado mediante el kit de purificación de “ADN Bioclean purification from gel” (Biotools), para permitir la digestión. Aproximadamente 5 µg de ADN genómico se digirió con la enzima de restricción MboI a una concentración de 10U/µg de ADN. Los productos resultantes se ligaron a un adaptador (para la secuencia de adaptador ver Refseth *et al.*, 1997) y enriquecidos para secuencias repetidas. Se llevó a cabo una captura por hibridación con sondas marcadas con biotina en el extremo 3' consistentes en las repeticiones: ACAG, AGAT, AAAG, AAG, GAT, CT y CA, que posteriormente fueron unidas a cuentas recubiertas de estreptavidina (Dynabeads M-280, Invitrogen). A continuación, los fragmentos capturados fueron amplificados y ligados en el vector pGEM-T vector

(Promega) y transformados en células competentes TOPO de *E. coli* (TOPO TA cloning, Invitrogen). Las bacterias dejaron crecer una noche a 37 ° C en placas de agar LB suplementado con ampicilina y X-Gal/IPTG. Los recombinantes se identificaron por medio de la detección azul / blanco, y las colonias que contienen microsatélites se identificaron por PCR de colonias, como se describe en Bloor *et al.* (2006), utilizando los cebadores universales para el vector M13 y la sonda correspondiente de repetición. Los clones positivos fueron secuenciados en un secuenciador automatizado de ADN ABI 3730 (Applied Biosystems).

De un total de 1296 colonias evaluadas, 318 clones positivos fueron identificados y secuenciados (24,5%), de los cuales 78 secuencias contenían secuencias repetidas adecuadas para el diseño de cebadores. Las secuencias restantes fueron descartadas porque contenían repeticiones de gran tamaño (más de 400bp de longitud) o secuencias minisatélites. Fueron diseñados pares de cebadores para secuencias únicas con el programa Primer3 (Rozen y Skaletsky, 2000). Todos los pares de iniciadores fueron evaluados inicialmente en reacciones individuales de ocho individuos.

Se obtuvieron productos del tamaño esperado para 14 loci. Un cebador de cada par fue marcado con fluorescencia (6-FAM, VIC, NED o PET, Applied Biosystems) para examinar los niveles de polimorfismo. Otros dos loci fueron descartados debido a la presencia de múltiples picos artificiales. Cuarenta y cinco individuos provenientes de dos localidades [Coto Ríos, Jaén, España (N = 23), y Resco Simontano, Arezzo, Italia (N = 22)] fueron genotipados para determinar los niveles de polimorfismo. El ADN genómico se extrajo de la misma manera que se ha explicado anteriormente. Se llevaron a cabo reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) en volúmenes de reacción de 10 µl

con los siguientes: 10x de tampón de PCR, 0,2 mM de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl₂, 0,1 U de Taq polimerasa (Biotools), 0,5 µM de cada cebador y 5 ng de ADN de las muestras. Las condiciones de PCR consistieron en un paso de desnaturalización inicial a 95 ° C durante 5 min, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 95 ° C durante 30 s, temperatura anillamiento (ver Tabla 1) durante 45 s, y extensión a 72 ° C durante 45 s, con un paso de elongación final a 72 ° C durante 5 min. Los productos marcado con fluorescencia se analizaron en un secuenciador automático ABI 3730 (Applied Biosystems) con el estándar GeneScan-500 (LIZ) de tamaño interno y los genotipos se obtuvieron utilizando el programa GeneMapper 3.7 (Applied Biosystems). La utilidad potencial de estos loci en otros taxa de cangrejos de río se evaluó mediante la amplificación cruzada de especies en las condiciones mencionadas utilizando uno o dos individuos de siete especies diferentes de las familias Astacidae y Cambaridae (Tabla 2).

Las medidas básicas de diversidad genética, así como las pruebas de la desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) y desequilibrio de ligamiento se realizaron para cada localidad utilizando el programa GENEPOP (Raymond y Rousset, 1995). La corrección secuencial de Bonferroni se aplicó para ajustar el nivel de significación para comparaciones múltiples (Rice, 1989). Los 12 loci fueron polimórficos, con entre dos y seis alelos por locus (media = 3,6) (ver Tabla 1); las heterocigosidades observada (H_O) y esperada (H_E) a través de los loci varió entre 0,19 y 0,69 y 0,22 y 0,60, respectivamente (Tabla 1). Los valores de heterocigosis de la muestra italiana ($H_O = 0.25$, $SE = 0.38$) fueron similares a los publicados en *A. i. italicus* de la Península Italiana con loci antes descritos (Bertocchi *et al.*, 2008), y más altos para la muestra de población española ($H_O = 0.52$, $SE = 0.51$). Las comparaciones

por pares de los 12 loci no revelaron evidencia de desequilibrio de ligamiento después de la corrección secuencial de Bonferroni. Las pruebas de desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg (HW) revelaron desviaciones significativas del equilibrio de HWE ($P < 0,05$) menos tres loci (Aitali2, Aitali4 y Aitali9) en la muestra de España y en tres loci (Aitali2, Aitali3 y Aitali5) en la muestra de Italia después de la corrección secuencial de Bonferroni (Rice, 1989), debido a un exceso de homocigotos. Se llevó a cabo una prueba de alelos nulos por muestra utilizando el programa MICROCHECKER (Van Oosterhout *et al.*, 2004), que reveló evidencia de la presencia de alelos nulos en un locus (Aitali5), tanto en las muestras de española como italiana (aunque la frecuencia de alelos nulos fue baja $< 0,2$, Chapuis y Estoup, 2007). La mayoría de los individuos fueron amplificados con éxito (el 2% de ampliaciones no funcionó en todos los loci), lo que podría implicar que la deficiencia de heterocigosis posiblemente está relacionada con fenómenos como el apareamiento no aleatorio en estas poblaciones o como consecuencia de selección (Tabla 1). Siete de los 12 loci (Aitali1, Aitali5, Aitali7, Aitali8, Aitali9, Aitali10 y Aitali11) se amplificaron con éxito en al menos una de las especies filogenéticamente más cercanas.

Tabla 1. Características de los loci microsatélites aislados en este trabajo para el cangrejo de río europeo *Austropotamobius italicus*.

Locus	Secuencias del cebador (5'-3')	Motivo	Tamaño (bp)	Ta (C°)	NA	HO	HE
Aitali1	F: ACGAGTCTTGTTCGCAACCT‡ R: GCCAAAGCACAACTGAGTGA	(CA) ₁₂	203-225	60	6	0.308	0.601
Aitali2	F: GAGAGGGTATGCTTCAAATCAG° R: ATATCATGCGCGTCATCTCC	(ACAG) ₁₄ AGATAGAC(ACAG) ₆	275-283	62	4	0.572	0.562
Aitali3	F: CACACGAGCACCCAGACATTG‡ R: CGTTGATGGTAGAGGGGAAG	(TCTG) ₇ TC(TCTG) ₃ TC(TCTS) ₅	193-199	60	4	0.345	0.591
Aitali4	F: CGTCACCGACCATATAAAGTG* R: CAAACACATTGTCCGTAAGCA	(CTGT) ₁₆	179-227	51	3	0.695	0.432
Aitali5	F: CACTACCCACACGGAATGTG† R: TGGCGATATGATGCCTACTG	(ACAS) ₁₅	227-255	60	5	0.250	0.409
Aitali6	F: GCCTAAACGCTGCTTGTGT* R: TGTTAGCCTGGGAAGAGAA	(ACAG) ₃ ATGG(ACAG) ₁₀ AC(ACAR) ₁₄	168-174	60	3	0.200	0.222
Aitali7	F: TCTGCTGGCTCTTTGAGAT° R: TCCTGCAGACACAAATAGGAGA	((GTCT) ₃ GT) ₂ N ₄₇ (GTCT) ₃ N ₁₀ (GTCT) ₇	352-364	60	3	0.300	0.291
Aitali8	F: GGGATATACGGATATATGGATGAG° R: TCAGAAATGTCCAACAAACCA	(ACAG) ₃ ATAGG(CAGM) ₁₇	170-176	58	4	0.602	0.488
Aitali9	F: TTCACATATCGTAACAGCCC† R: TCTGGGCTACGTTCAACTCC	(CASA) ₆	287-333	60	3	0.497	0.604
Aitali10	F: GCTGTAGGTTAATACCTGGGTTTG† R: TGCAGACACAAATAGCGGAGT	(TGTS) ₆ TGGG(TGTS) ₄	249-253	60	4	0.188	0.284
Aitali11	F: GACAAAATTGGCCGCCTAAC° R: ATGTTGCTGTTAAGCCTCTG	(GACA) ₁₁	212-216	54	3	0.358	0.468
Aitali12	F: TGAGAGGTGGTGCCAAAGAG‡ R: GCCCGGACAGAAACAAATA	(AC) ₃₀	181-193	64.7	2	0.348	0.403

Marcaje de cebadores: °6-FAM, †VIC, y ‡NED; NA, número de alelos por locus; heterocigosidad esperada (H_E) y observada (H_O).

Ta = temperatura de anillamiento.

Tabla 2. Amplificación cruzada de los loci aislados en diferentes especies de cangrejos de río, pertenecientes a las familias Cambaridae y Astacidae.

Locus	Astacidae	Cambaridae					
	<i>Pacifastacus leniusculus</i>	<i>Cambarellus puer</i>	<i>Cambarellus texanus</i>	<i>Cambarellus montezumae</i>	<i>Cambarellus shufeldtii</i>	<i>Orconoeetes virilis</i>	<i>Procambarus clarkii</i>
Aitali1	205	-	-	-	-	-	-
Aitali2	-	-	-	-	-	-	-
Aitali3	-	-	-	-	-	-	-
Aitali4	-	-	-	-	-	-	-
Aitali5	-	-	-	-	-	211, 219	-
Aitali6	-	-	-	-	-	-	-
Aitali7	-	402	-	344	-	-	-
Aitali8	120	149	162, 202	-	198	213	-
Aitali9	287	-	-	-	-	-	-
Aitali10	-	249	253	-	-	253	251
Aitali11	176	-	212, 216	216	-	216	212, 216
Aitali12	187	-	-	168, 193	-	-	-

En caso de obtenerse se indica el tamaño de los alelos amplificados, - indica amplificación no exitosa.

REFERENCIAS

- Bertocchi, S., Brusconi, S., Gherardi, F., Grandjean, F., Souty-Grosset, C., 2008. Genetic variability of the threatened crayfish *Austropotamobius italicus* in Tuscany (Italy): Implications for its management. *Fundamental y Applied Limnology/Archiv für Hydrobiologie* 173, 153-164.
- Bloor, P., I.H.-B. de Laguna y Kemp, S.J., 2006. Highly polymorphic tetranucleotide microsatellite loci for the eastern Canary lizard *Gallotia atlantica*. *Mol. Ecol. Notes* 6, 737-739.
- Chapuis, M.-P., Estoup, A., 2007. Microsatellite null alleles y estimation of population differentiation. *Mol Biol Evol* 24, 621-631.
- Diéguez-Urbeondo, J., Temino, C., Muzquiz, J.L., 1997. The crayfish plague fungus (*Aphanomyces astaci*) in Spain. *Bull. Fr. Peche Piscic.* 70, 753-763.
- Fratini, S., Zaccara, S., Barbaresi, S., Grandjean, F., Souty-Grosset, C., Crosa, G., Gherardi, F., 2005. Phylogeography of the threatened crayfish (genus *Austropotamobius*) in Italy: Implications for its taxonomy y conservation. *Heredity* 94, 108-118.
- Gouin, N., Grandjean, F., Souty-Grosset, C., 2006. Population genetic structure of the endangered crayfish *Austropotamobius pallipes* in france based on microsatellite variation: Biogeographical inferences y conservation implications. *Freshwat. Biol.* 51, 1369-1387.
- Gouin, N., Souty-Grosset, C., Ropiquet, A., Grandjean, F., 2002. High dispersal ability of *Austropotamobius pallipes* revealed by microsatellite markers in a french brook. *Bull. Fr. Pêche Piscic* 367, 681-689.
- Raymond, M., Rousset, F., 1995. An exact test for population differentiation. *Evolution* 49, 1280-1283.
- Refseth, U., Fangen, B., Jakobsen, K., 1997. Hybridization capture of microsatellites directly from genomic DNA. *Electrophoresis* 18, 1519-1523.
- Rice, W.R., 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 43, 223-225.
- Rozen, S., Skaletsky, H., 2000. Primer3 on the www for general users y for biologist programmers. *Methods Mol Biol* 132, 365-386.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Laboratory, New York.

Van Oosterhout, C., Hutchinson, W.F., Wills, D.P.M., Shipley, P., 2004. Micro-checker: Software for identifying y correcting genotyping errors in microsatellite data. Mol. Ecol. Notes 4, 535-538.

Capítulo 3

Estructura genética de las poblaciones del cangrejo de río *Austropotamobius italicus* (faxon, 1914) en España, basada en la variabilidad de loci microsatélites.

3.1 INTRODUCCIÓN

El mantenimiento del potencial evolutivo de las especies en peligro de extinción es un objetivo fundamental en la biología de la conservación. El cangrejo de río, *Austropotamobius italicus* (Lereboullet, 1858), es un especie endémica al oeste y sur de Europa (Souty-Grosset *et al.*, 2006). Esta especie está experimentando una disminución drástica de sus poblaciones, que se ha atribuido a factores como la pérdida de hábitat, la contaminación del agua y los efectos de la expansión de especies de cangrejo alóctonas que han introducido distintas enfermedades en la mayor parte de sus hábitats (Dieguez-Uribeondo *et al.*, 2008). Sin embargo, diferentes cuestiones sobre taxonomía han afectado su consideración formal como una especie en peligro por las mismas razones que su especie hermana, *Austropotamobius pallipes*, que sí ha sido incluida en el libro rojo de especies en peligro de extinción desde 1983 (Baillie y Groombridge, 1996) y que figura en el Anexo 2 de la Directiva sobre hábitats como especie que requiere medidas especiales de conservación.

Debido a que las poblaciones españolas de cangrejo de río *A. italicus* no han sido objeto de un estudio genético detallado, se tomó la decisión de emplear un enfoque genético molecular con el fin de evaluar la distribución de la variación genética en las poblaciones españolas. Este enfoque es particularmente apropiado para las especies que sufren un descenso rápido de la población, ya que proporciona información importante para las estrategias de gestión, si es que tales acciones deben ser empleados (Hedrick, 2000). Debido a la escasa variación mitocondrial observada y su relación con los haplotipos de poblaciones de Italia, se dio lugar a la hipótesis que sugiere un origen por translocación humana de todas las poblaciones españolas (Grandjean *et al.*, 2000;

Trontelj *et al.*, 2005). Sin embargo, como se ha visto en el capítulo I de esta tesis, que incluye un muestreo geográfico y genético más exhaustivo, se ha encontrado una considerable variación mitocondrial, y ha dado las bases para sugerir que los cambios históricos en la demografía y la distribución debería considerarse como posible explicación para los patrones genéticos observados (Dieguez-Uribeondo *et al.* 2008; Pedraza Lara *et al.*, 2010). Este trabajo pretende arrojar luz sobre esta cuestión mediante la comparación de la variación nuclear entre las poblaciones españolas y las poblaciones italianas cercanas.

Por otra parte, la acumulación de diferencias genéticas a través de un aislamiento reproductivo es un factor crítico a considerar en la definición de líneas evolutivas para la conservación (Moritz, 1995). Por ello, se ha propuesto definir ESU's como aquellos grupos de poblaciones que son recíprocamente monofiléticos considerando la estructura de haplotipos de ADN mitocondrial, y que sean el resultado de desviaciones significativas en las frecuencias de alelos en loci nucleares.

La variación mitocondrial se ha evaluado en estudios previos (Dieguez-Uribeondo *et al.*, 2008; Grandjean *et al.*, 2001; Pedraza Lara *et al.*, 2010), mostrando una variabilidad considerable y evidencia de una estructuración geográfica determinada. De acuerdo con la definición de ESU (Moritz, 1995), el polimorfismo en los loci nucleares tiene que ser evaluado a fin de confirmar la hipótesis de varios ESUs de *A. i. italicus* en España.

A la luz de este resultado, se propuso la hipótesis de divergencia entre estos grupos de poblaciones, probablemente como resultado de una separación durante el

Pleistoceno. En este contexto y en búsqueda de una mayor potencia en los análisis, el uso de nuevos marcadores nucleares es necesaria para aclarar la estructura genética entre las poblaciones españolas de *A. italicus*. El objetivo de este estudio fue examinar la variación genética loci de microsatélites en poblaciones españolas de *A. i. italicus* y analizar su distribución en una muestra representativa de la distribución de la especie en España. Esta información finalmente puede proporcionar datos relevantes para la conservación del cangrejo de río.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Colección de datos

Como se ha documentado antes, *Austropotamobius italicus* tiene una distribución restringida, y en la actualidad se limita principalmente a las cabeceras de algunos sistemas fluviales (Pedraza-Lara *et al.*, 2010). Con el fin de cubrir la mayor parte de su distribución en España, un total de 17 poblaciones se tomaron muestras en las principales cuencas españolas donde se encuentra hoy en día entre 2006 y 2007 (Fig. 1). Se incluyó una población adicional proveniente de Italia (Tevere) del río Tíber. Se tomó un quelípedo de cada individuo mismo que se conservó en etanol puro para el procesamiento posterior.

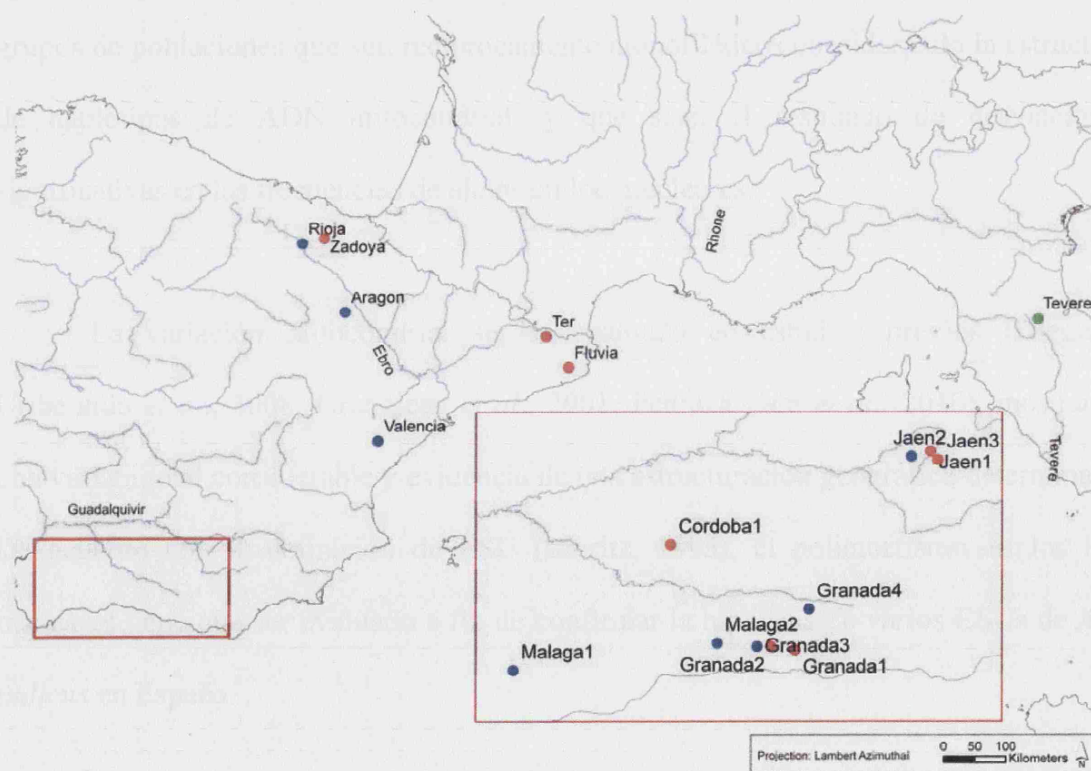


Figura 1. Mapa de localización de las muestras incluidas. Detalles sobre el tamaño de muestra se puede ver en la Tabla 1. Los puntos de color corresponden al análisis de agrupación bayesiana (ver Figura 4).

3.2.2 Análisis de microsatélites

Fueron utilizados los doce loci polimórficos, previamente aislados de *A. italicus* (Pedraza-Lara *et al.*, 2010) junto con los loci AP1, AP3 y AP6, de *A. pallipes* (Gouin *et al.*, 2000). Estos 15 microsatélites se utilizaron en el presente estudio para evaluar la variación genética en *A. italicus*. Se llevó a cabo amplificación en cadena de la polimerasa (PCR) en volúmenes de reacción de 12uL que contenían 10x de tampón de PCR (Biotools), 1,0-2,0 mM de MgCl₂, 2,0 mM de cada cebador (“forward” y “reverse”), 0.1 mM de cada dNTP, 0,25 U de Taq ADN polimerasa (Biotools) y 1 uL de ADN de muestra (10ng/uL). El perfil de temperatura de las PCR fue el siguiente, 94 ° C durante 5 min., 35 ciclos a 90 ° C durante 1 min., temperatura de hibridación estandarizada para cada cebador por 45 seg. y 72 ° C durante 1 min., seguidos de una extensión final de 7 min. a 72 ° C. Los cebadores “forward” se marcaron con fluorescentemente (Invitrogen) y los fragmentos de PCR amplificados fueron analizados y sus tamaños estimados por comparación con un estándar de tamaño mediante electroforesis en un secuenciador automatizado de capilares ABI 3100. Los tamaños de los alelos se obtuvieron utilizando GeneMapper 3.7 (Applied Biosystems). Aproximadamente el 1% de las muestras fueron re-amplificadas para garantizar la repetibilidad del genotipado.

3.2.3 Análisis estadístico

3.2.3.1 Determinación del genotipo y de la diversidad genética entre loci

Se cuantificó la diversidad genética de los loci microsatélites por locus y sitio de muestreo, como se calcula por el número medio de alelos por locus (NA), la

heterocigosidad observada (H_o), la heterocigosidad esperada (H_e) y el número de alelos estandarizados por la muestra con el tamaño más pequeño (NS) (Nei y Chesser, 1983), utilizando GENETIX 4.05 (Belkir, 2000) y Fstat 2.9.3 (Goudet, 2001). La estima de la heterocigosidad imparcial esperada (Nei, 1987) fue utilizada debido al pequeño tamaño de muestra de algunas poblaciones. Se analizó la posibilidad de desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg mediante el test de probabilidad exacta (Guo y Thompson, 1992), disponible en el programa GENEPOP 4.0.1 (Raymond y Rousset, 1995) y aplicándose a cada locus para cada población así como en todos los loci para cada población. Se probó la existencia de desequilibrio genotípico de ligamiento entre cada par de loci por medio de la prueba exacta de Fisher con GENEPOP 4.0.1. Tanto las pruebas de desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg y de desequilibrio de ligamiento utilizaron una cadena de Markov (10000 pasos de memorización, 1000 grupos, 2000 iteraciones / grupo) (Guo y Thompson, 1992). Todos los valores de P de las comparaciones múltiples fueron corregidos mediante la corrección secuencial de Bonferroni (Rice, 1989).

Se llevó a cabo una prueba bimodal para detectar posibles errores de genotipado debido a la amplificación preferencial de uno de los dos alelos, mala interpretación de las bandas o errores de transcripción por locus y sitio de muestreo, utilizando el programa DROPOUT (McKelvey y Schwartz, 2005). Además, fue utilizado el programa MICRO-CHECKER v2.23 (Van Oosterhout *et al.*, 2004), para evaluar la existencia de alelos nulos, y considerar su impacto en las estimas de diferenciación genética.

3.2.3.2 *Diferenciación de las poblaciones*

Con el fin de comprobar si las mutaciones paso a paso en los loci microsatélites (modelo de mutación paso a paso, SMM, por sus siglas en inglés) contribuían significativamente a la diferenciación genética entre las agrupaciones, se implementó una prueba basada en un procedimiento de asignación al azar de los tamaños de los alelos, (Hardy *et al.*, 2003) utilizando el software SPAGeDI 1.1 (Hardy y Vekemans, 2002). Una diferencia significativa indica que los estadísticos basadas en el tamaño de los alelos (R_{ST}) son más adecuados que los basados en su identidad (F_{ST} , IAM (Weir y Cockerham, 1984)). Esta prueba también puede proporcionar información valiosa sobre las principales causas de la diferenciación de la población (es decir, deriva frente a mutación) mediante la comparación de valores de F_{ST} y R_{ST} . En términos generales, se espera que F_{ST} y R_{ST} sean de la misma magnitud cuando la diferenciación es causado sólo por deriva, mientras que las R_{ST} serían mayores que F_{ST} considerando el SMM (ver Hardy *et al.*, 2003; Lugon-Moulin *et al.*, 1999). También se llevó a cabo esta prueba entre las poblaciones dentro de los grupos para determinar el estadístico adecuado para evaluar la diferenciación genética. La significación se estimó a partir de 1000 pasos de aleatorización. Basándose en los resultados de estas pruebas, la diferenciación genética entre las poblaciones se estimó usando F_{ST} por pares (Weir y Cockerham, 1984).

Tradicionalmente se han utilizado las F_{ST} y más recientemente, las G_{ST} y sus derivados han demostrado tener atributos indeseables cuando se calculan a partir de marcadores altamente polimórficos como los microsatélites (Hedrick, 1999; Hedrick, 2005; Heller *et al.*, 2010; Heller y Siegmund 2009; Jost, 2008; Nagylaki, 1998). Por lo tanto, el nivel de diferenciación genética entre las poblaciones (en general y por pares)

se evaluó usando una medida alternativa desarrollada recientemente, las D_{EST} (Jost, 2008), utilizando el software SMOGD versión 1.2.5 (2010) (Crawford, 2010). La significación de los valores de D_{EST} no fue probada, ya que el principal objetivo de las medidas de diferenciación por lo general no es para evaluar si se desvían o no de cero. Más bien, lo más importante de las medidas de diferenciación es que sean objetivas y que reflejen sin desviaciones los atributos de la distribución de la variabilidad alélica. En este sentido, D_{EST} es superior a las medidas tradicionales derivados de F_{ST} . Con fines de compararlos con los valores de D_{EST} , se estimaron las θ_{ST} de Weir y Cockerham (Weir y Cockerham, 1984) utilizando el programa Arlequin versión 3.1 (Excoffier *et al.*, 2005). La significación se estimó a partir de 10.000 permutaciones.

3.2.3.3 Estructura genética y flujo

Para determinar la cantidad de estructuración entre los diferentes niveles de agrupación genética, se llevó a cabo un análisis de varianza molecular (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992), con el programa Genodive versión 2.0b17 (Meirmans y Tienderen Van, 2004). Se llevó a cabo la normalización de Meirmans de los estadísticos de F (por sus valores máximos posibles), previa transformación de los datos en Recode_Data (Meirmans, 2006). AMOVA se utilizó para evaluar la partición de la variación microsatélite en las frecuencias alélicas (F_{ST}) tanto entre como dentro de los diferentes esquemas de agrupación: 1) Poblaciones españolas Vs. Tevere, 2) la asignación de STRUCTURE, 3) vertientes hidrológicas (Atlántico-Mediterráneo-Cantábrico), 4) distintas cuencas fluviales. La significación de los valores de P se ajustó mediante la corrección de Bonferroni para múltiples pruebas estadísticas (Rice, 1989), con un valor de α de 0,05. Para visualizar la relación entre las muestras de poblaciones

se llevó a cabo un análisis de correspondencia (Guinand, 1996) en el programa Genetix v.4.05.2 (Belkir, 2000).

Con el fin de determinar la estructura genética del cangrejo de río, se utilizó el programa STRUCTURE 2.0 (Pritchard *et al.*, 2000), el cual se basa en un modelo de agrupación bayesiana utilizando Cadenas de Markov Montecarlo (MCMC) para determinar el número de poblaciones (K) con la probabilidad posterior más alta y para estimar las proporciones de mezcla genética de los individuos. Las simulaciones se llevaron a cabo utilizando un modelo de mezcla genética y asumiendo una correlación entre la frecuencia de alelos de las distintas poblaciones (los parámetros de la corrida de MCMC consistió en 5x10⁵ iteraciones de “quemado”, seguidos de 2x10⁶ iteraciones en la muestra). La inferencia del valor más probable del número de poblaciones se basó en el valor modal de K (Evanno *et al.*, 2005). El intervalo de valores posibles de K fue de uno a diecisiete, utilizando cinco corridas en paralelo para cada número supuesto de K poblaciones.

Se aplicó una prueba de asignación bayesiana en el programa GENECLASS 2.0 (Piry *et al.*, 2004), que proporciona la probabilidad de cada individuo de pertenecer a la población de referencia, es decir, la población del río Tíber. El cálculo siguió el método de exclusión parcial (Rannala y Montaña, 1997), y la simulación consistió en 10.000 individuos.

Para probar la hipótesis de una subdivisión abrupta, y reciente en la población, posiblemente causado por la influencia humana sobre la estructura genética, se utilizó el programa BayesAss + v1.3 (Wilson y Rannala, 2003). Este método calcula una matriz

de pares de tasas de inmigración reciente (m) entre las poblaciones utilizando métodos coalescentes. La configuración por defecto de “burn-in” y el número de iteraciones de MCMC fueron suficientes para alcanzar la convergencia con base en la inspección visual de los valores de verosimilitud. Cinco corridas independientes fueron implementadas para evaluar la congruencia entre corridas, y posteriormente se utilizó una prueba del ratio de verosimilitud para determinar si las probabilidades previas y posteriores en las tasas de migración eran significativamente diferentes entre sí (Wilson y Rannala, 2003).

3.3 RESULTADOS

Los niveles de polimorfismo fueron bajos para la mayoría de los loci microsatélites, con de 3 a 19 alelos por locus (NA medio = $7, \pm 4.3$), y los valores medios de heterocigosidad observada y esperada fueron $H_O = 0,35 \pm 0,19$ y $H_E = 0,42 \pm 0,17$, respectivamente (Tabla 1). El coeficiente de endogamia varió entre 0.012 y 0.483 (FIS medio = $0,153 \pm 0,26$), y seis loci mostraron equilibrio de Hardy-Weinberg en todas las muestras de poblaciones (Tabla 1). La prueba del desequilibrio de ligamiento mostró un número muy bajo de comparaciones significativas por pares (1,9%), lo que sugiere la independencia de todos los loci examinados.

3.3.1 Diversidad genética entre las poblaciones

El conjunto de la variabilidad genética entre las poblaciones fue homogénea, como lo indica el valor promedio de alelos estimado (NA = $2,84 \pm 0,37$), y por la heterocigosidad observada ($H_O = 0,35 \pm 0,085$) y esperada ($H_E = 0,42 \pm 0,036$) (Tabla 1). El coeficiente de endogamia en las poblaciones a través de todos los loci fue en promedio de $0,138 \pm 0,29$. Ocho de las poblaciones mostraron los valores medios del FIS significativos, lo que indica desviaciones significativas del equilibrio de Hardy-Weinberg debido al exceso de homocigotos (Tabla 1).

Tabla 1. Resumen de estadísticos genéticos para los 15 loci microsatélites y cada una de las 17 poblaciones de *Austropotamobius italicus* incluidas en el análisis.

Población	N	N _A	H _E	H _O	F _{IS}
Córdoba1	20.267	3.067	0.517	0.523	0.2593
Granada1	21.800	2.800	0.461	0.444	0.0609
Granada2	20.467	2.867	0.467	0.511	0.8742
Jaén1	16.133	3.067	0.512	0.262	0.0002
Málaga1	19.667	3.533	0.509	0.449	0.0004
Málaga2	19.533	3.000	0.441	0.417	0.0202
Rioja	19.800	3.200	0.463	0.348	0.0002
Valencia	9.333	3.067	0.399	0.276	0.0002
Granada3	19.933	2.933	0.443	0.376	0.0002
Granada4	22.000	2.400	0.375	0.359	0.099
Jaen2	8.933	2.267	0.373	0.317	0.0063
Aragón	19.133	2.200	0.283	0.271	0.1433
Fluviá	19.067	3.200	0.413	0.342	0.0002
Ter	21.800	3.067	0.405	0.375	0.0173
Zadoya	6.667	2.533	0.429	0.232	0.0002
Jaén3	18.733	2.600	0.325	0.376	0.9944
Tevere	19.333	3.067	0.387	0.311	0.0002

Locus	N _A	NS	H _E	H _O	F _{IS}
AP1	5	2.184	0.167	0.165	0.012
AP3	19	6.154	0.632	0.426	0.326
AP6	14	6.464	0.630	0.373	0.408
B_1	7	4.135	0.513	0.265	0.483
C_1	6	4.434	0.566	0.410	0.276
D_5	7	3.84	0.554	0.734	-0.326
G_9	8	4.843	0.559	0.753	-0.348
1.12C	6	4.013	0.554	0.440	0.206
2.9H	3	2.051	0.312	0.221	0.292
3.3A	3	2.652	0.259	0.180	0.304
A9	4	2.525	0.360	0.330	0.084
C5	8	5.98	0.507	0.418	0.176
2.11F	7	2.197	0.142	0.077	0.463
F9	3	2.072	0.401	0.368	0.082
H5	5	2.24	0.153	0.173	-0.137

N = tamaño de la muestra; N_A = número total de alelos por locus y número medio de alelos por muestra, respectivamente; N_S = riqueza alélica media estandarizada por el tamaño mínimo de muestra (13) por locus y por población, usando el método de rarefacción de FSTAT 2.9.3 (Goudet, 2001); valores medios de heterocigosidad esperada (H_E) y observada (H_O), así como estadístico de Wright (F_{IS}) por locus y población. Valores de F_{IS} en negritas indican pruebas significativas, luego de aplicar la corrección secuencial de Bonferroni (Rice 1989).

La prueba estadística bimodal aplicada a las frecuencias alélicas fue no significativo, mostrando que no existe evidencia de la existencia de errores de genotipado, o una amplificación inespecífica de alelos, lo cual podría resultar en la presencia de alelos nulos. Además, la prueba de alelos nulos basada en la proporción de homocigotos y la distribución de los tamaños de los alelos heterocigotos (Van Oosterhout *et al.*, 2004), detectó que un 14% de las comparaciones pareadas presentaron un desequilibrio de Hardy-Wainberg, principalmente debido a los loci Ap6, G9 y 2.11F. Se encontró que la corrección de las frecuencias de alelos nulos (Brookfield, 1996) no afectaba cualitativamente los resultados (12% de las comparaciones por pares fueron todavía significativos, datos no mostrados). Esto sugiere que los posibles alelos nulos han tenido un efecto muy bajo sobre la diversidad genética promedio de los datos, y por lo tanto el conjunto completo de datos fue incluido en los análisis.

3.3.2 Número de poblaciones y asignación de los individuos

El análisis bayesiano de agrupación (Pritchard *et al.*, 2000) detectó el mayor “likelihood” para el modelo de $K = 2$. Sin embargo, el valor modal de ΔK fue observado en $K = 3$ (Figs. 2 y 3).

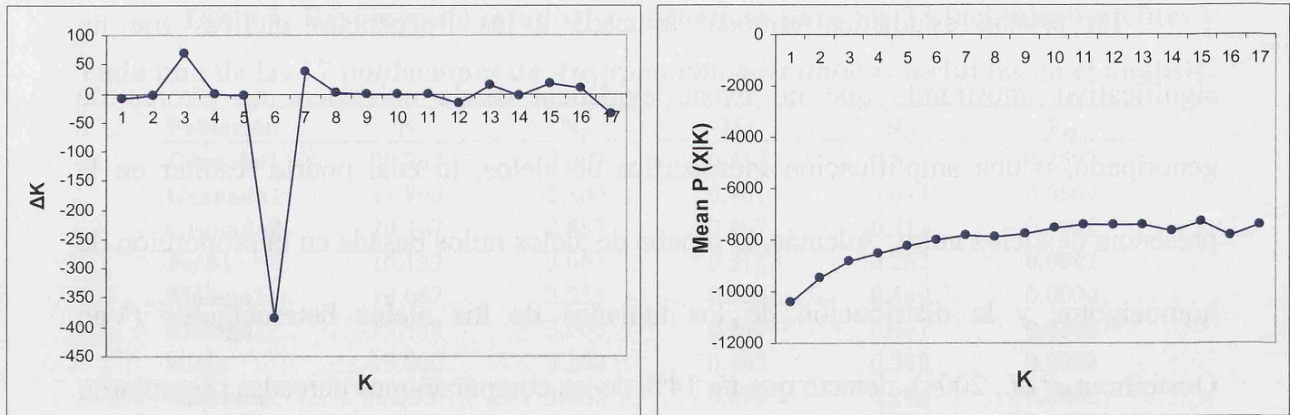


Figura 2. Número de poblaciones de *A. italicus* con el valor de probabilidad posterior más alto, expresado como ΔK , para cada una de las 17 poblaciones (K). ΔK es calculada como el valor medio de la segunda derivada de $L(K)$ (Evanno *et al.*, 2005).

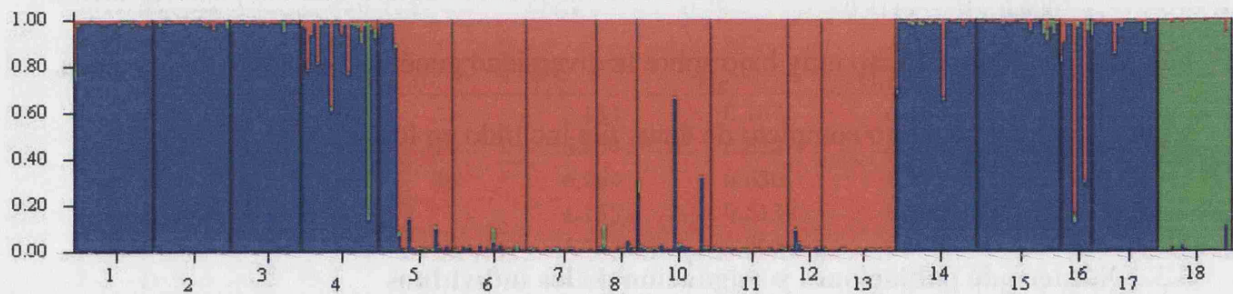


Figura 3. Análisis de agrupación bayesiana mostrando el numero de poblaciones con la mayor probabilidad posterior de asignación ($K=3$). La designación de los números está expresada en el mismo orden que se muestra en la Tabla 1. Los colores de los grupos genéticos están indicados en cada localidad en la Figura 1.

La prueba bayesiana de asignación asignó correctamente la mayor parte de los individuos a su localidad de origen. La asignación de la muestra Tíber resultó sólo en individuos pertenecientes a esa población, con la excepción de un individuo de la población JP10, asignado a esa población con una probabilidad de 0,87.

3.3.3 Diferenciación genética

La hipótesis nula de no contribución del modelo gradual de mutación (SMM, (Michalakis y Excoffier, 1996) a la diferenciación genética ($F_{ST} = \rho R_{ST}$) fue rechazada ($P > 0,01$), con base en los datos multilocus en su conjunto (Tabla 2), lo que sugiere que las F_{ST} son más adecuadas que las R_{ST} para el cálculo de la diferenciación genética entre las muestras de población blanca, cangrejos de río (Hardy *et al.*, 2003). Sólo un locus mostró diferencias significativas en la prueba de permutación de alelos (Tabla 2). Sin embargo, el valor significativo de la prueba global de R_{ST} considerando todos los loci (0,578, $P=0,001$, IC 95% 0,175-0,524), sugiere una estructuración de la población.

Tabla 2. Resumen de los estadísticos de la prueba de permutación del tamaño de los alelos (Hardy *et al.*, 2003) para cada locus e intervalo de confianza del 95% para los valores de R_{ST} simulados.

Locus	F _{ST}	R _{ST}	pR _{ST} (95%C.I.)		G _{ST} '
AP1	0.2315	0.2310	0.2327	0.1432-0.3337	0.2050
AP3	0.2257	0.3659	0.2303	0.0818-0.4920	0.2250
AP6	0.1681	0.1285	0.1695	0.0722-0.3068	0.1880
B_1	0.2724	0.3207	0.2669	0.1320-0.4182	0.2570
C_1	0.1942	0.4765	0.2117	0.0231-0.5077	0.1960
D_5	0.1033	0.0653	0.1116	0.0409-0.2433	0.1000
G_9	0.2296	0.0496	0.2549	0.0296-0.6618	0.2340
1.12C	0.208	0.0839	0.1965	0.0538-0.3238	0.2010
2.9H	0.3351	0.3334	0.3185	0.2323-0.3479	0.3470
3.3A	0.5007	0.6045	0.5462	0.3868-0.6729	0.5300
A9	0.3078	0.5783	0.3599	0.2383-0.5840	0.2830
C5	0.3686	0.8417	0.3579	0.1159-0.7824	0.3680
2.11F	0.0266	0.0113	0.0158	-0.0116-0.0490	0.0260
F9	0.1954	0.1619	0.1916	0.1620-0.2045	0.1840
H5	0.3393	0.3393	0.3393	0.3393-0.3393	0.1780
All	0.2531	0.5784	0.3045	0.1755-0.5249	0.2510

Los valores significativos de G_{ST} se indican en negritas ($R_{ST} > \rho R_{ST}$), luego de aplicar la corrección secuencial de Bonferroni (Rice, 1989).

Las comparaciones pareadas con base en los valores de F_{ST} corregidos no fueron significativas para la mayoría de las comparaciones (153 comparaciones), después de aplicar la corrección de Bonferroni. Las D_{EST} observadas mostraron valores de diferenciación especialmente altos entre el Tíber y el resto de las poblaciones españolas (Tabla 3).

Tabla 3. Estimados de F_{ST} (diagonal superior) y D_{EST} (diagonal inferior) entre pares de localidades provenientes del análisis multilocus de *Austropotamobius italicus* (15 loci microsatélites).

	Córdoba	Granada1	Granada2	Jaén1	Málaga1	Málaga2	Rioja	Valencia	Granada3	Granada4	Jaén2	Aragón	Fluvia	Ter	Zadoya	Jaén3	Tevere
Córdoba	--	0.086	0.141	0.096	0.155	0.207	0.197	0.243	0.158	0.265	0.186	0.363	0.215	0.243	0.173	0.315	0.334
Granada1	0.0312	--	0.0750	0.1270	0.1640	0.2120	0.2000	0.2700	0.1840	0.3070	0.2500	0.3360	0.2180	0.2700	0.1550	0.2230	0.3420
Granada2	0.1111	0.0277	--	0.1430	0.1060	0.1360	0.1840	0.2370	0.2020	0.3120	0.2290	0.2970	0.1680	0.2110	0.1260	0.1660	0.3620
Jaén1	0.0482	0.0720	0.1051	--	0.1260	0.1750	0.1590	0.2280	0.1800	0.2690	0.2120	0.3280	0.2220	0.2450	0.1400	0.2830	0.3370
Málaga1	0.1060	0.1123	0.0654	0.1139	--	0.0650	0.0380	0.1020	0.1180	0.1800	0.1250	0.2220	0.1360	0.1680	0.0540	0.2200	0.3500
Málaga2	0.1359	0.1342	0.0821	0.1116	0.0362	--	0.0790	0.1720	0.1900	0.2110	0.1570	0.2710	0.2260	0.2410	0.1600	0.2770	0.3970
Rioja	0.1341	0.1036	0.1155	0.1005	0.0263	0.0289	--	0.0980	0.1820	0.1760	0.1310	0.1740	0.2130	0.2440	0.1210	0.2760	0.4130
Valencia	0.2057	0.1732	0.1194	0.1991	0.0642	0.0930	0.0755	--	0.1850	0.2160	0.2300	0.3480	0.1940	0.2210	0.2080	0.4120	0.4270
Granada3	0.0936	0.0923	0.1252	0.1203	0.0640	0.0649	0.1074	0.1295	--	0.2220	0.2200	0.3610	0.2760	0.2910	0.2230	0.3930	0.3710
Granada4	0.1723	0.1786	0.1632	0.1708	0.0800	0.0741	0.0702	0.0831	0.1130	--	0.1400	0.2230	0.2550	0.2890	0.1720	0.3670	0.4400
Jaén2	0.0717	0.1022	0.1168	0.1333	0.0591	0.0689	0.0587	0.1134	0.1349	0.0303	--	0.2440	0.2460	0.2820	0.1600	0.3290	0.4080
Aragón	0.3051	0.2012	0.1818	0.3069	0.1678	0.1556	0.0809	0.2282	0.2216	0.0557	0.1067	--	0.3080	0.3710	0.2520	0.3100	0.5050
Fluvia	0.1210	0.0960	0.0360	0.1835	0.0823	0.1515	0.1733	0.1046	0.2089	0.1456	0.1459	0.1564	--	0.0450	0.0810	0.2910	0.3900
Ter	0.1624	0.1481	0.0834	0.1976	0.1131	0.1574	0.2001	0.1494	0.2527	0.1963	0.1772	0.2245	0.0205	--	0.1540	0.3420	0.4170
Zadoya	0.1340	0.0975	0.0523	0.1230	0.0973	0.1543	0.1870	0.1243	0.2453	0.1542	0.1598	0.2340	0.0345	0.0457	--	0.1400	0.3560
Jaén3	0.1752	0.0833	0.0604	0.2038	0.1341	0.1463	0.1473	0.3146	0.2872	0.1603	0.1406	0.1363	0.1157	0.1607	0.1123	--	0.4560
Tevere	0.3009	0.2666	0.2775	0.3289	0.3794	0.4292	0.5343	0.4302	0.3363	0.4165	0.3993	0.5536	0.3234	0.3761	0.3547	0.3473	--

Los valores de comparaciones que incluyen a la población del río Tíber están señalados en cursivas.

El AMOVA jerárquica reveló una estructura genética significativa entre las muestras analizadas ($P = 0,001$) (Tabla 4). Todos los sistemas de agrupación mostraron que la mayor parte de la variación es atribuible a la variación genética de cada individuo. El siguiente nivel de organización en mantener la variación genética se encontró entre los grupos propuestos en cada estructura probada. De entre estas estructuras, la variación entre las poblaciones sin ningún tipo de esquema de agrupación explicó la mayor proporción de la variación (24,6% significativa, $P = 0,001$), seguido de la hipótesis de agrupación de las poblaciones de España contra las poblaciones de Italia (21,6%, no significativa, $P > 0,01$) y la resultante de los grupos inferidos por STRUCTURE ($K = 3$, 11.2, significativa, $P = 0,001$).

Tabla 4. Análisis molecular de la varianza (AMOVA) considerando la variación espacial en *Austropotamobius italicus*.

Agrupado en	Fuente de la variación	% variación	Estadísticos	F	SE	P
Población	Dentro de Individuo	72.3	<i>Fit</i>	0.277	0.08	--
	Entre Individuos	3.1	<i>Fis</i>	0.041	0.089	0.092
	<i>Entre Poblaciones</i>	24.6	<i>Fst</i>	0.246	0.034	0.001
Población España Vs Italia	Dentro de Individuo	57.8	<i>Fit</i>	0.422	0.078	--
	Entre Individuos	2.5	<i>Fis</i>	0.041	0.089	0.11
	Entre Poblaciones	18.1	<i>Fsc</i>	0.231	0.037	0.001
	<i>EspañaVsItalia</i>	21.6	<i>Fct</i>	0.216	0.069	0.446
Población STRUCTURE K3	Dentro de Individuo	68.9	<i>Fit</i>	0.311	0.076	--
	Entre Individuos	2.9	<i>Fis</i>	0.041	0.089	0.086
	Entre Poblaciones	16.9	<i>Fsc</i>	0.191	0.032	0.001
	<i>Entre grupos StructureK3</i>	11.2	<i>Fct</i>	0.112	0.036	0.001
Población Vertiente	Dentro de Individuo	69.4	<i>Fit</i>	0.306	0.077	--
	Entre Individuos	2.9	<i>Fis</i>	0.041	0.089	0.083
	Entre Poblaciones	21	<i>Fsc</i>	0.225	0.037	0.001
	<i>Entre vertientes</i>	6.6	<i>Fct</i>	0.066	0.026	0.458
Población Basins	Dentro de Individuo	68.5	<i>Fit</i>	0.315	0.077	--
	Entre Individuos	2.9	<i>Fis</i>	0.041	0.089	0.098
	Entre Poblaciones	19.8	<i>Fsc</i>	0.217	0.039	0.001
	<i>Entre cuencas</i>	8.8	<i>Fct</i>	0.088	0.028	0.503

En negritas se indican los valores significativos. En cursivas están señaladas las hipótesis de agrupación probadas.

El test de Wilcoxon encontró evidencia de cuellos de botella recientes en la mayoría de las muestras de poblaciones, excepto en las muestras Tevere, Jaen3, Fluvía y Valencia ($P < 0,001$ prueba de una cola del exceso de heterocigotos) bajo el modelo de alelos infinitos (IAM). La prueba realizada usando el modelo de dos fases (TPN, Di Rienzo *et al.*, 1994) y el SMM no mostró resultados significativo para el resto de las muestras de poblaciones.

La proporción de migrantes fue estimada de acuerdo a dos esquemas, entre las poblaciones y entre los grupos genéticos identificados por STRUCTURE. Los valores significativos de la prueba de χ^2 y de la prueba entre los ratio de likelihood ($P < 0,001$) excluyó la posibilidad de que existiera una falta de polimorfismo para detectar las tasas de migración entre las muestras en el programa BayesAss. Las comparaciones pareadas entre las localidades muestran que la población de La Rioja es el mayor contribuyente con migrantes a otras poblaciones (Figura 5). La prueba de “Jackknifing” mostró que la mayoría de las poblaciones se comportan como fuentes en términos de su propia reclutación, con la excepción de los que recibieron la mayor proporción de inmigrantes. Éstas fueron Málaga2, Granada2 y Granada3 (valores de auto-asignación de 0.680, 0.681 y 0.678, respectivamente), recibiendo inmigrantes de La Rioja, Málaga2 y Málaga1.

3.4 DISCUSIÓN

Los loci microsatélites son marcadores nucleares que han demostrado ser útiles en la detección del flujo genético, así como para el estudio de la estructura genética de las poblaciones a escala fina en otras especies de cangrejos de río (Walker *et al.*, 2002), lo que puede ser atribuido, entre otras razones a la alta tasa de mutación que les caracteriza (Goldstein *et al.*, 1999). Los estudios que comparan los datos nucleares y mitocondriales representan una herramienta valiosa para discernir los factores históricos y recientes que participan en la conformación de la estructura genética de las poblaciones de cangrejos de río (Crandall *et al.*, 2000).

Los quince loci microsatélites empleados en este estudio mostraron niveles de polimorfismo de moderados a bajos (Gouin *et al.*, 2006) y no mostraron evidencias significativas de desequilibrio de ligamiento. Sólo dos de los loci analizados mostraron desviaciones del equilibrio de HW. La estimación global de R_{ST} significativa indica un alto grado de estructuración en las muestras de las poblaciones. Las D_{EST} por pares variaron entre 0,020 y 0,553, mientras que las F_{ST} entre 0.045 y 0.505. Las estimaciones más altas de diferenciación se observaron entre el Tíber y las poblaciones de España. Las F_{ST} se estimaron en este estudio para su comparación con trabajos anteriores en esta especie o de su especie más cercana, *A. pallipes*. Además, no se encontró evidencia de que la mutación paso contribuyera significativamente a la diferenciación entre las poblaciones ($P < 0.05$), lo que demuestra que la deriva fue probablemente la fuerza más importante en la diferenciación. En este sentido, los niveles de diferenciación, medidos en valores de F_{ST} , variaron en magnitud de acuerdo a la población. Estos valores fueron similares a los reportados entre las poblaciones de un mismo grupo genético de *A.*

pallipes en Francia (Gouin *et al.*, 2006) pero de mayor magnitud a los reportados para la especie en la región de Carintia (Baric *et al.*, 2006), misma que se ha propuesto tiene un origen por translocación. Se observaron bajos niveles de polimorfismo genético en general, mostrando entre 2,2 y 3,2 como promedio de alelos por población. Sin embargo, esto parece ser común para las especies incluidas en el género *Austropotamobius* en comparación con los niveles encontrados en especies de otros géneros, que han sido más altos (Walker *et al.*, 2002). Los niveles de heterocigosis observada de 0,213 a 0,523, se encuentran entre los niveles de otras poblaciones naturales de cangrejo de río de la familia Astacidae (Edsman *et al.*, 2002; Gouin *et al.*, 2006).

Es probable que los altos niveles de polimorfismo encontrados fueran los responsables de la detección de una estructuración genética global débil. Considerando los análisis de diferenciación, la mayoría de los patrones genéticos podrían estar relacionados con la diferenciación de la población del río Tíber del resto. Además, la prueba de agrupación bayesiana rechazó la hipótesis nula de panmixia entre las poblaciones españolas, y en su lugar es coherente con la hipótesis de la existencia de dos agrupaciones diferentes, correspondientes a grupos genéticos diferentes. En conjunto, estos análisis soportan que al menos dos agrupaciones genéticas se pueden identificar en España. Todas estas evidencias apuntan a una alta diferenciación entre las poblaciones de Italia y las provenientes de España, que a su vez, no apoyan la hipótesis de una historia reciente compartida entre ambos grupos. Estas evidencias apoyan resultados anteriores basados en la variación genética mitocondrial entre las poblaciones ibéricas (Beroiz *et al.*, 2008; Dieguez-Urbeondo *et al.*, 2008; Pedraza Lara *et al.*, 2010)

respecto a su diferenciación genética de las poblaciones italianas más cercanas, pertenecientes a la misma subespecie (Pedraza-Lara *et al.*, 2010).

El patrón de diferenciación antes mencionado es parcialmente soportado por el AMOVA jerárquico y el análisis de correspondencia, aunque la inferencia de una falta de significación entre cualquiera de las otras hipótesis de agrupación geográfica dentro de España, muestra que esta diferenciación no está arreglada geográficamente.

La asignación de los individuos a sus respectivas poblaciones en general fue fuerte, como se observa en los diferentes métodos de asignación utilizados. El análisis de cuellos de botella encontró evidencias altamente significativas de modificaciones demográficas drásticas y recientes para la mayoría de las poblaciones. Teniendo en cuenta que, como se ha mencionado antes, la principal fuerza de diferenciación genética de las poblaciones españolas es la deriva, estas evidencias en su conjunto soportan que las poblaciones españolas probablemente han sido afectadas por un fuerte efecto fundador, que ha llevado al mantenimiento de diferentes frecuencias alélicas en cada población. La naturaleza de este proceso fundador podría estar relacionado con varios factores como la fuerte reducción en el tamaño de las poblaciones, así como su fragmentación y aislamiento desde la documentada extinción de la mayoría de las poblaciones de cangrejo de río en España (Alonso *et al.*, 2000).

Además, el flujo genético entre las poblaciones es coherente con las estimas de migración, que sustentan a la población de La Rioja en calidad de donante relativamente importante de otras poblaciones. Las actividades humanas de repoblación han sido ampliamente adoptadas como medidas de recuperación de la especie en la mayoría de

los países europeos, y estas prácticas podrían haber sido comunes también en España (Gil-Sánchez y Alba Tercedor, 2006; Machino *et al.*, 2004), donde la siembra constante y la fundación de nuevas poblaciones podría explicar el patrón observado en la mayoría de las poblaciones. Distinguir entre ambas posibilidades requeriría de una representación más completa de las poblaciones y determinar con más precisión en cada caso el posible donante y aceptor de individuos y sus proporciones. La evidencia proveniente de las tasas de migración inferidas y la asignación genética que aquí se presenta apoyan la consideración de al menos dos grupos genéticos diferentes en *Austropotamobius italicus* en España con un grado de mezcla distinto y con diferente distribución, uno asociado principalmente con el norte y el noreste de la Península Ibérica y otro con la parte sur de su distribución (al sur de las cuencas de Levante). Mayores niveles de contacto y de flujo entre poblaciones es observado en la parte sur, posiblemente como resultado de desplazamientos humanos.

Los diferentes tipos de marcadores genéticos pueden resultar en patrones contrastantes en la estructura genética entre poblaciones de una especie determinada (Brown *et al.*, 2005; Buonaccorsi *et al.*, 2001). En algunos casos, la discordancia entre los tipos de marcador puede deberse a sesgos metodológicos, que cuando se corrigen adecuadamente permiten obtener patrones comunes (Brown *et al.*, 2005; Buonaccorsi *et al.*, 2001). En otros casos sin embargo, los resultados contradictorios en la descripción de la estructura genética de la población pueden derivarse de los efectos diferenciales de la deriva genética y la mutación en una clase marcador (Buonaccorsi *et al.*, 2001). En tales casos, la discordancia puede interpretarse como una fuente de información alternativa y complementaria útil para investigar cómo los procesos evolutivos en escalas de tiempo diferentes definen la distribución de la heterogeneidad genética.

Previos hallazgos con marcadores mitocondriales mostraron la existencia de una expansión de las poblaciones ibéricas durante el Pleistoceno. La evidencia de este estudio revela información a diferentes escalas temporales y espaciales, la cual además es coherente con un escenario en que acontecimientos muy recientes han influido significativamente sus poblaciones y proporciona así un ejemplo de información complementaria entre marcadores genéticos.

REFERENCIAS

- Alonso, F., Temiño, C., Diéguez-Urbeondo, J., 2000. Status of the white-clawed crayfish, *Austropotamobius pallipes* (Iereboullet, 1858), in Spain: Distribution and legislation. Bull. Fr. Pêche Piscic., 31-53.
- Baric, S., Hollrigl, A., Fureder, L., Petutschnig, J., Dalla Via, J., 2006. First analysis of genetic variability in carinthian populations of the white-clawed crayfish *Austropotamobius pallipes*. Bull. Fr. Pêche Piscic. 380, 977-990.
- Belkir, K., P. Borsa, L. Chickhi, N. Raufaste and F. Bonhomme (ed.), 2000. Genetix 4.04 logici el sous windows tm, pour la génétique des poblacions. Université de Montpellier II, Laboratoire Génome, Poblacions, Interactions, CNRS UMR 5000, Montpellier, France.
- Beroiz, B., Callejas, C., Alonso, F., Ochando, M.D., 2008. Genetic structure of spanish white-clawed crayfish (*Austropotamobius pallipes*) populations as determined by rapid analysis: Reasons for optimism. Aquat. Conserv.: Mar. Freshwat. Ecosyst. 18.
- Brookfield, J.F.Y., 1996. A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. Mol. Ecol. 5, 453-455.
- Crandall, K.A., Bininda-Emonds, O.R.P., Mace, G.M., Wayne, R.K., 2000. Considering evolutionary processes in conservation biology. Trends Ecol. Evol. 15, 290-295.
- Crawford, N., 2010. SMOGD: Software for the measurement of genetic diversity. Molecular Ecology Resources 10, 556-557.
- Di Rienzo, A., Peterson, A.C., Garza, J.C., Valdes, A.M., Slatkin, M., Freimer, N.B., 1994. Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 91, 3166-3170.
- Dieguez-Urbeondo, J., Royo, F., Souty-Grosset, C., Ropiquet, A., Grandjean, F., 2008. Low genetic variability of the white-clawed crayfish in the Iberian peninsula: Its origin and management implications. Aquat. Conserv.: Mar. Freshwat. Ecosyst. 18.
- Edsman, L., Farris, J., Källersjö, M., Prestegard, T., 2002. Genetic differentiation between noble crayfish, *Astacus astacus*, populations detected by microsatellite length variation in the rDNA ITS1 region. Bull. Fr. Pêche Piscic 367, 691-706.
- Evanno, G., Regnaut, S., Goudet, J., 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: A simulation study. Mol. Ecol. 14, 2611-2620.

- Excoffier, L., Laval, G., Schneider, S., 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1, 47-50.
- Excoffier, L., Smouse, P.E., Quattro, J.M., 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances entre DNA haplotypes - application to human mitochondrial-DNA restriction data. *Genetics* 131, 479-491.
- Gil-Sánchez, J., Alba-Tercedor, J., 2006. The decline of the endangered populations of the native freshwater crayfish (*Austropotamobius pallipes*) in southern Spain: It is possible to avoid extinction? *Hydrobiologia* 559, 113-122.
- Goldstein, D.B., Roemer, G.W., Smith, D.A., Reich, D.E., Bergman, A., Wayne, R.K., 1999. The use of microsatellite variation to infer population structure and demographic history in a natural model system. *Genetics* 151, 797-801.
- Goudet, J., 2001. Fstat, a programme to estimate and test gene diversities and fixation indices, version 2.9.3. Available from: [Http://www.Unil.Ch/izea/software/fstat.Html](http://www.Unil.Ch/izea/software/fstat.Html).
- Gouin, N., Grandjean, F., Souty-Grosset, C., 2000. Characterization of microsatellite loci in the endangered freshwater crayfish *Austropotamobius pallipes* (Astacidae) and their potential use in other decapods. *Mol Ecol* 9, 636-638.
- Gouin, N., Grandjean, F., Souty-Grosset, C., 2006. Population genetic structure of the endangered crayfish *Austropotamobius pallipes* in France based on microsatellite variation: Biogeographical inferences and conservation implications. *Freshwat. Biol.* 51, 1369-1387.
- Grandjean, F., Gouin, N., Souty-Grosset, C., Dieguez-Urbeondo, J., 2001. Drastic bottlenecks in the endangered crayfish species *Austropotamobius pallipes* in Spain and implications for its colonization history. *Heredity* 86, 431-438.
- Grandjean, F., Harris, D.J., Souty-Grosset, C., Crandall, K.A., 2000. Systematics of the European endangered crayfish species *Austropotamobius pallipes* (Decapoda: Astacidae). *Journal of Crustacean Biology* 20, 522-529.
- Guinand, B., 1996. Use of a multivariate model using allele frequency distributions to analyze patterns of genetic differentiation between populations. *Biol. J. Linn. Soc.* 58, 173-195.
- Guo, S.W., Thompson, E.A., 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* 48, 361-372.

- Hardy, O., Charbonnel, N., Fréville, H., Heuertz, M., 2003. Microsatellite allele sizes: a simple test to assess their significance on genetic differentiation. *Genetics* 163, 1467.
- Hardy, O.J., Vekemans, X., 2002. Spagedi: Versatile computer program to analyze spatial genetic structure at the individual or population levels. *Mol. Ecol. Notes* 2, 618-620.
- Hedrick, P., 1999. Perspective: Highly variable loci and their interpretation in evolution and conservation. *Evolution* 53, 313-318.
- Hedrick, P.W., 2000. Applications of population genetics and molecular techniques to conservation biology. In: Clarke, A.G.Y.G.M. (Ed.), *Genetics, demography and viability of fragmented populations*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, p. 113.
- Hedrick, P.W., 2005. A standardized genetic differentiation measure. *Evolution* 59, 1633-1638.
- Heller, R., Okello, J.B.A., Siegismund, H., 2010. Can small wildlife conservancies maintain genetically stable populations of large mammals? Evidence for increased genetic drift in geographically restricted populations of cape buffalo in east Africa. *Mol. Ecol.* 19, 1324-1334.
- Heller, R., Siegismund, H.R., 2009. Relationship between three measures of genetic differentiation G_{st} , d_{est} and G'_{st} : How wrong have we been? *Mol. Ecol.* 18, 2080-2083.
- Jost, L., 2008. G_{st} and its relatives do not measure differentiation. *Mol. Ecol.* 17, 4015-4026.
- Lereboullet, A., 1858. Description de deux espèces d'écrevisses de nos rivières. *Mém. Soc. Sci. Nat. Strasbourg* 5, 11p. + 13 pl.
- Lugon-Moulin, N., Brunner, H., Balloux, F., Hausser, J., Goudet, J., 1999. Do riverine barriers, history or introgression shape the genetic structuring of a common shrew (*Sorex araneus*) population? *Heredity* 83, 155-161.
- Machino, Y., Füreder, L., Laurent, P.J., Petutsching, J., 2004. Introduction of the white-clawed crayfish *Austropotamobius pallipes* in Europe. *Ber. Naturwiss.-Med. Ver. Innsbruck* 91, 187-212.
- McKelvey, K.S., Schwartz, M.K., 2005. Dropout: A program to identify problem loci and samples for noninvasive genetic samples in a capture-mark-recapture framework. *Mol. Ecol. Notes* 5, 716-718.

- Meirmans, P., 2006. Using the AMOVA framework to estimate a standardized genetic differentiation measure. *Evolution* 60, 2399-2402.
- Meirmans, P.G., Van Tienderen, P.H., 2004. Genotype and Genodive: Two programs for the analysis of genetic diversity of asexual organisms. *Mol. Ecol. Notes* 4, 792-794.
- Michalakis, Y., Excoffier, L., 1996. A generic estimation of population subdivision using distances between alleles with special reference for microsatellite loci. *Genetics* 142, 1061.
- Moritz, C., 1995. Uses of molecular phylogenies for conservation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 349, 113-118.
- Nagylaki, T., 1998. Fixation indices in subdivided population. *Genetics* 148, 1325.
- Nei, M., 1987. *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York, USA.
- Nei, M., Chesser, R., 1983. Estimation of fixation indices and gene diversities. *Annals of Human Genetics* 47, 253-259.
- Pedraza-Lara, C., Alda, F., Carranza, S., Doadrio, I., 2010. Mitochondrial DNA structure of the Iberian populations of the white-clawed crayfish, *Austropotamobius italicus italicus* (faxon, 1914). *Mol. Phylogen. Evol.* 57(1): 327-342.
- Piry, S., Alapetite, A., Cornuet, J., Paetkau, D., Baudouin, L., Estoup, A., 2004. GeneClass2: A software for genetic assignment and first-generation migrant detection. *Journal of Heredity* 95, 536.
- Pritchard, J.K., Stephens, M., Donnelly, P., 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155, 945-959.
- Rannala, B., Mountain, J.L., 1997. Detecting immigration by using multilocus genotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 9197-9201.
- Raymond, M., Rousset, F., 1995. An exact test for population differentiation. *Evolution* 49, 1280-1283.
- Rice, W.R., 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 43, 223-225.
- Souty-Grosset, C., Holdich, D.M., Noël, P.Y., Reynolds, J.D., Haffner, P., 2006. *Atlas of crayfish in Europe*. Museum national d'Histoire naturelle, Paris.

- Trontelj, P., Machino, Y., Sket, B., 2005. Phylogenetic and phylogeographic relationships in the crayfish genus *Austropotamobius* inferred from mitochondrial COI gene sequences. *Mol. Phylogen. Evol.* 34, 212-226.
- Van Oosterhout, C., Hutchinson, W.F., Wills, D.P.M., Shipley, P., 2004. Micro-checker: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol. Ecol. Notes* 4, 535-538.
- Walker, D., Porter, B., Avise, J., 2002. Genetic parentage assessment in the crayfish *Orconectes placidus*, a high-fecundity invertebrate with extended maternal brood care. *Mol. Ecol.* 11, 2115-2122.
- Weir, B.S., Cockerham, C.C., 1984. Estimating f-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38, 1358-1370.
- Wilson, G.A., Rannala, B., 2003. Bayesian inference of recent migration rates using multilocus genotypes. *Genetics* 163, 1177-1191.

Capítulo 4

**Filogenia y patrones evolutivos de la
subfamilia de cangrejos de río**

Cambarellinae (Decapoda, Cambaridae).

4.1 INTRODUCCIÓN

La subfamilia Cambarellinae es un grupo de cangrejos de río que se compone del género *Cambarellus*, con 17 especies reconocidas y una distribución a lo largo de los ríos de la Costa del Golfo México en los Estados Unidos y en el Norte y centro de México (Figura 1) (Hobbs, 1974a). Esta distribución va desde el río Swanee en el norte de Florida, hacia el este, incluyendo buena parte del sur de la cuenca del río Misissipi hasta el sur de Illinois y hacia el suroeste continúa hasta el río Nueces, en Texas (Fitzpatrick Jr., 1983; Hobbs, 1950). En México, *Cambarellus* tiene una distribución discontinua con tres poblaciones distantes y aisladas en los estados norteros de Chihuahua, Coahuila y Nuevo León y después en el centro de México, principalmente a lo largo del Cinturón Volcánico Transversal (CVT) (Villalobos, 1955; Hobbs, 1980). Este grupo compuesto principalmente por especies que habitan en los lagos y hábitats lénticos. No está claro cómo se ha originado esa distribución amplia y discontinua por lo que un primer objetivo con este estudio es aportar información útil para inferir los patrones biogeográficos en la historia evolutiva de la subfamilia Cambarellinae.

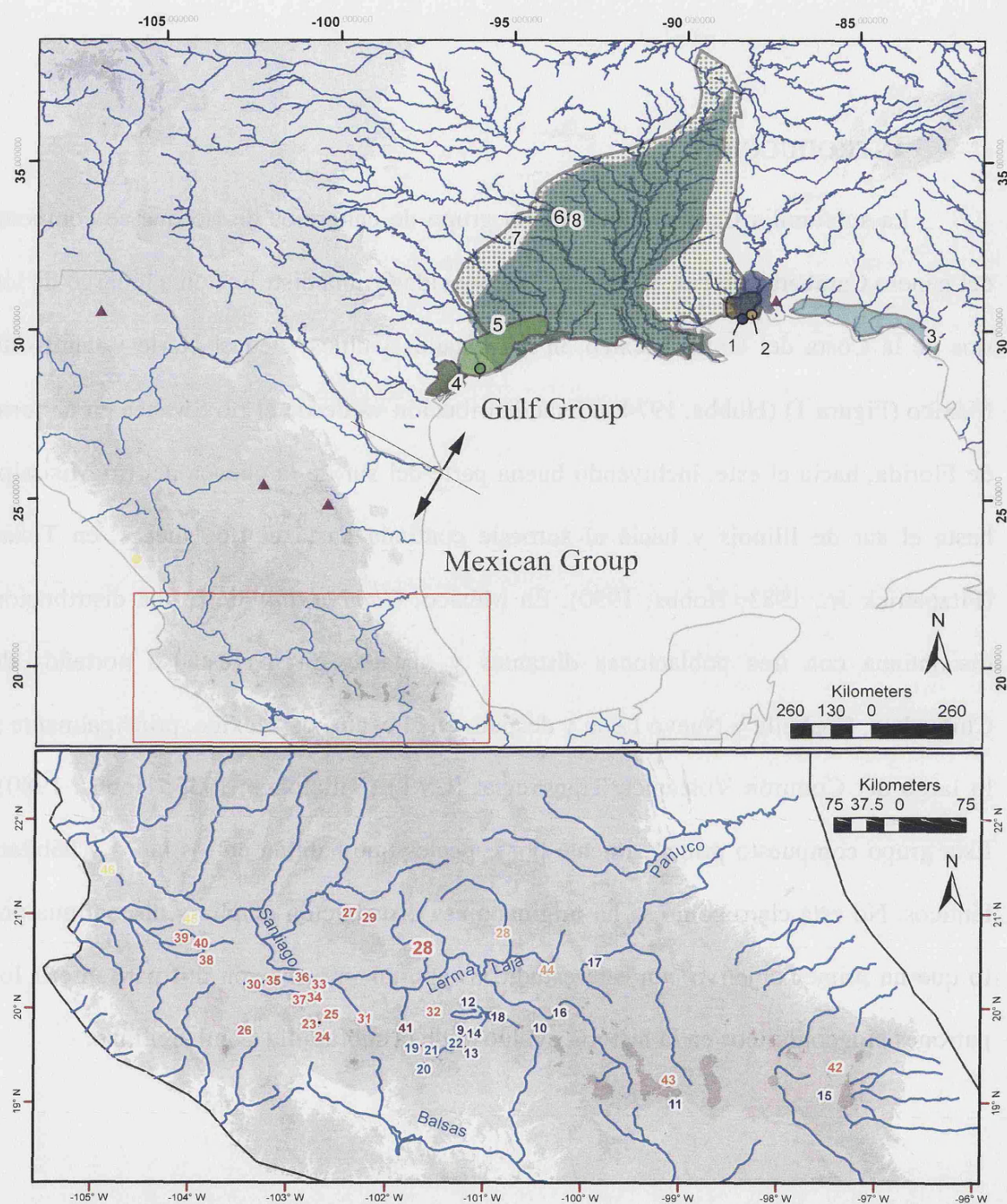


Figura 1. Mapa de las localidades incluidas en este estudio, se hace referencia a los números en la Tabla 1. Las áreas sombreadas corresponden a las zonas de distribución reportadas para las especies del Grupo del Golfo. Los colores representan diferentes clados recuperados por análisis filogenético (ver Figura 3). Los triángulos son especies no incluidas en el análisis y representan la ubicación de las localidades tipo, que son los únicos registros para estas especies. El aumento en la intensidad del tono de gris se da en función del de altitud (500-6000 m).

Una serie de caracteres apomórficos definen a la subfamilia, a consecuencia de lo cual su monofilia ha sido aceptada desde su descripción. Un tamaño corporal reducido, una fórmula branquial específica, un annulus ventrales (genitales femeninos) móviles y alargados y la ausencia del proceso cefálico en el primer par de pleópodos (genitales masculinos) son algunas de las sinapomorfías propuestas del grupo (Fitzpatrick Jr, 1983; Hobbs, 1974a ; Laguarda, 1961). La unidad morfológica que define a la subfamilia contrasta con la amplia variación morfológica encontrada en los caracteres dentro de las poblaciones de varias especies (Villalobos 1955, Fitzpatrick 1983, Rojas *et al.* 2007). Esta diversidad dentro y entre las especies hace que la designación e identificación de caracteres diagnósticos sea especialmente difícil, especialmente para las especies de amplia distribución (Fitzpatrick Jr, 1983; Villalobos, 1955).

A pesar de la distribución geográfica enigmática y la diversidad de especies en Cambarellinae, la única hipótesis filogenética del grupo se basa principalmente en las asociaciones fenéticas de la morfología genital (Figura 2, Fitzpatrick Jr, 1983). Con base en esta hipótesis, tres subgéneros han sido propuestos (Fitzpatrick Jr, 1983), *Pandicambarus* (que contiene siete especies), y el monotípico *Dirigicambarus*, ambos compuestos por especies habitando al norte del Río Grande (en lo sucesivo, el Grupo del Golfo), y *Cambarellus*, que contiene a las especies al sur del Río Grande (denominado aquí como Grupo México). Sin embargo, no se han propuesto caracteres sinapomórficos para apoyar estas clasificaciones subgenéricas y no ha sido evaluada formalmente una hipótesis filogenética utilizando caracteres moleculares y morfológicos. Por lo tanto, se propone estimar dicha hipótesis filogenética para el grupo de manera robusta, con un conjunto sólido de datos moleculares. Como resultado,

utilizamos este marco filogenético para proponer una taxonomía coherente para el grupo y para poner a prueba distintas hipótesis biogeográficas sobre el origen y propagación de la subfamilia Cambarellinae.

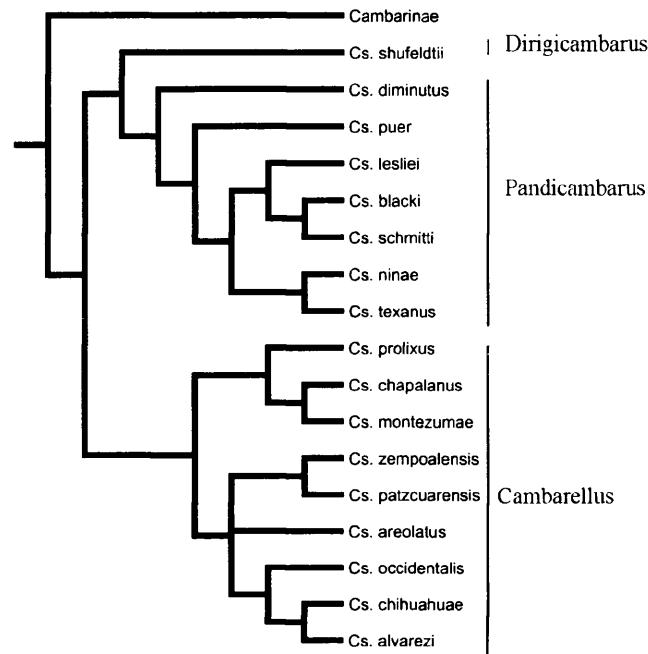


Figura 2. Hipótesis filogenética y subgéneros basados en caracteres morfológicos de la subfamilia Cambarellinae (género *Cambarellus*) (Fitzpatrick, 1983).

Adicionalmente, este estudio busca caracterizar los patrones de especiación en la subfamilia a través de la historia filogenética de las especies dentro de la subfamilia. Los patrones de la diversidad filogenética se ven afectados por sus características geográficas y la historia geológica debido a sus efectos sobre la especiación alopátrica (Barracough y Vogler, 2000). Teniendo en cuenta las características geográficas contrastantes (Figura 1), junto con las historias geológicas distintas de los dos grupos de Cambarellinae, serán usadas filogenias moleculares reconstruidas para servir de modelo de los linajes observados en el tiempo (Lineage Trough Time Plots, LTT), que permitirá poner a prueba la tasa y el patrón de cambio a través de los linajes (Harvey *et al.*, 1994;

Nee, 2006; Rabosky, 2007). En este capítulo se ha utilizado nuestra base de datos moleculares de la subfamilia Cambarellinae para inferir el tiempo y modo de acumulación de linajes (patrones de especiación menos extinción), en primer lugar, para identificar los factores biogeográficos más importantes que han afectado la cladogénesis en el grupo, y en segundo lugar para determinar si ha habido patrones contrastantes entre los patrones de las tasas de diversificación de ambos componentes geográficos, definidos como el grupo del Golfo y el grupo de México, como resultado de historias biogeográficas contrastantes.

El objetivo central de este trabajo es el planteamiento de una hipótesis filogenética robusta como base para: definir las relaciones entre las especies de de la subfamilia, poner a prueba hipótesis taxonómicas y biogeográficas y probar hipótesis cladogenéticas en el grupo.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Muestreo y secuenciación

Fueron colectadas cincuenta muestras cubriendo 14 de las 17 especies a través del intervalo de distribución de la subfamilia Cambarellinae (Figura 1). Se llevó a cabo la identificación taxonómica usando las claves existentes (Hobbs, 1974b). Los dos intervalos geográficos de la subfamilia fueron cubiertos, a lo largo de la zona Neártica y la zona de Transición de América del Norte, desde la cuenca del río Misisipi al CVT en el centro de México. La mayoría de las especies pudieron ser obtenidas, pero los tejidos de las especies con intervalos de distribución muy restringidos y / o habiendo sido colectados en un número reducido de veces se obtuvieron mediante especímenes de museo (Museo Nacional de Historia Natural, Smithsonian Institution) (Tabla 1).

Tabla 1. Localidades de muestreo de los individuos de la subfamilia Cambarellinae usados en este estudio. Los asteriscos indican ejemplares o localidades tipo.

Punto	Especie	Subgénero (Fitzpatrick, 1983)	Localidad	Cuenca	Tejido/ Voucher
1	<i>Cambarellus lesliei</i> *	<i>Pandicambarus</i>	Slough, 0.5 Mile S Of Alabama Port, Mobile County, junction Routes 163 Y 188, AL, USA	Mobile	NMNH146621
2	<i>Cambarellus diminutus</i> *	<i>Pandicambarus</i>	3 Mile W Grand Bay, US 90, Mobile County, AL, USA		NMNH116911
3	<i>Cambarellus schmitti</i>	<i>Pandicambarus</i>	Branford, Small Spring, Suwannee County, FL, USA	Suwannee	NMNH131694
4	<i>Cambarellus ninae</i>	<i>Pandicambarus</i>	6 Mile S, 1 mile W Of Port Lavaca, Calhoun County, TX, USA		NMNH133623
5	<i>Cambarellus puer</i>	<i>Pandicambarus</i>			KAC1233
6	<i>Cambarellus puer</i>	<i>Pandicambarus</i>	Drainage Ditch Y Backwater Of San Jacinto River, Montgomery County, TX, USA		NMNH220096
7	<i>Cambarellus shufeldtii</i>	<i>Dirigicambarus</i>	Oxbow Lake Of The Red River, 0.6 Mile SW Of Boyd, Lafayette County, AR, USA		NMNH208635
8	<i>Cambarellus shufeldtii</i>	<i>Dirigicambarus</i>	Floodplain, 6.6 Mile N Of Gilmer, Upshur County, TX, USA		NMNH219219
9	<i>Cambarellus sp.</i>	<i>Pandicambarus</i>	Bayou Dorcheat At US Highway 82, Lafayette County, AR, USA		NMNH208533
10	<i>Cambarellus texanus</i>	<i>Pandicambarus</i>			KAC1210
11	<i>Cambarellus texanus</i>	<i>Pandicambarus</i>			KAC1211
12	<i>Cambarellus shufeldtii</i>	<i>Dirigicambarus</i>			KAC1053
13	<i>Cambarellus sp.</i>	<i>Cambarellus</i>	Ciénega Santa María, Michoacán, México	Cuitzeo	
14	<i>Cambarellus sp.</i>	<i>Cambarellus</i>	Maravatío, Michoacán, México	Medio Lerma	
15	<i>Cambarellus sp.</i>	<i>Cambarellus</i>	Lagunas de Zempoala, Morelos, México	Interior	
16	<i>Cambarellus sp.</i>	<i>Cambarellus</i>	Dren La Cinta, Michoacán, México	Medio Lerma	
17	<i>Cambarellus sp.</i>	<i>Cambarellus</i>	Atécuaro, Michoacán, México	Cuitzeo	
18	<i>Cambarellus sp.</i>	<i>Cambarellus</i>	Chiquimitío, Michoacán, México	Cuitzeo	
19	<i>Cambarellus sp.</i>	<i>Cambarellus</i>	Lago cráter Aljojuca, Puebla México	Interior	
20	<i>Cambarellus sp.</i>	<i>Cambarellus</i>	Presa Tepuxtepec, Edo. México, México	Medio Lerma	
21	<i>Cambarellus sp.</i>	<i>Cambarellus</i>	Las Rosas, San Juan del Río, Querétaro, México	Pánuco	
22	<i>Cambarellus sp.</i>	<i>Cambarellus</i>	Loma Alta, Michoacán, México	Cuitzeo	
23	<i>Cambarellus patzcuarensis</i>	<i>Cambarellus</i>	Lago Patzcuaro, en Janitzio, Michoacán, México	Patzcuaro	
24	<i>Cambarellus patzcuarensis</i>	<i>Cambarellus</i>	Lago Zirahuén, en Opopeo Michoacán, México	Interior	

Tabla 1. Continuación

Punto	Especie	Subgénero (Fitzpatrick, 1983)	Localidad	Cuenca	Tejido/ Voucher
25	<i>Cambarellus patzcuarensis</i>	<i>Cambarellus</i>	Manantial Chapultepec, Michoacán, México	Patzcuaro	
26	<i>Cambarellus sp.</i>	<i>Cambarellus</i>	Manantial La Mintzita, Michoacán, México	Cuitzeo	
27	<i>Cambarellus chapalananus</i>	<i>Cambarellus</i>	Presa Cuernámaro, Tres Villas, Guanajuato, México	Turbio river	
28	<i>Cambarellus chapalananus</i>	<i>Cambarellus</i>	Laguna San Juanico, Cotija, Michoacán, México	Interior	
29	<i>Cambarellus chapalananus</i>	<i>Cambarellus</i>	Presa Huaracha, Jalisco, México	Chapala	
30	<i>Cambarellus chapalananus</i>	<i>Cambarellus</i>	Zapotlán lake, Jalisco, México	Interior	
31	<i>Cambarellus chapalananus</i>	<i>Cambarellus</i>	San Julian, Jalisco, México	Verde/Santiago	
32	<i>Cambarellus chapalananus</i>	<i>Cambarellus</i>	Embalse San Miguel, Guanajuato, México	La Laja	
33	<i>Cambarellus chapalananus</i>	<i>Cambarellus</i>	Embalse San Isidro, Jalisco, México	Verde/Santiago	
34	<i>Cambarellus chapalananus</i>	<i>Cambarellus</i>	Aijijic, en Lago Chapala, Jalisco, México	Chapala	
35	<i>Cambarellus chapalananus</i>	<i>Cambarellus</i>	Camécuaro river, Michoacán, México	Chapala	
36	<i>Cambarellus chapalananus</i>	<i>Cambarellus</i>	Manantial La Luz, Michoacán, México	Chapala	
37	<i>Cambarellus chapalananus</i>	<i>Cambarellus</i>	Jamay, en Lago Chapala, México	Chapala	
38	<i>Cambarellus chapalananus</i>	<i>Cambarellus</i>	La Palma, Michoacán, México	Chapala	
39	<i>Cambarellus chapalananus</i>	<i>Cambarellus</i>	Isla Patos, en Lago Chapala, México	Chapala	
40	<i>Cambarellus chapalananus</i>	<i>Cambarellus</i>	Ocotlán, Jalisco, México	Chapala	
41	<i>Cambarellus chapalananus</i>	<i>Cambarellus</i>	Negritos, Michoacán, México	Chapala	
42	<i>Cambarellus sp.</i>	<i>Cambarellus</i>	Arroyo San Juan, Jalisco, México	Ameca	
43	<i>Cambarellus sp.</i>	<i>Cambarellus</i>	Chapulimita stream, Jalisco, México	Ameca	
44	<i>Cambarellus sp.</i>	<i>Cambarellus</i>	Los Veneros, Jalisco, México	Ameca	
45	<i>Cambarellus sp.</i>	<i>Cambarellus</i>	Zacapu Lagoon, Michoacán, México	Angulo	
46	<i>Cambarellus montezumae</i>	<i>Cambarellus</i>	Lago cráter Quechulac, Puebla, México	Interior	
47	<i>Cambarellus montezumae</i>	<i>Cambarellus</i>	Xochimilco, Estado de México, México	Valle de México	
48	<i>Cambarellus sp.</i>	<i>Cambarellus</i>	Presa El Vegil, Ameco, Querétaro, México	Medio Lerma	
49	<i>Cambarellus occidentalis</i>	<i>Cambarellus</i>	Laguna Magdalena, Jalisco, México	Interior	
50	<i>Cambarellus occidentalis</i>	<i>Cambarellus</i>	Tepic, Nayarit, México	Santiago	
-	<i>Procambarnus tolteca</i>	-	Huichihuayán, San Luis Potosí, México	Pánuco	
-	<i>Procambarnus sp.</i>	-	Matla, Hidalgo, México	Pánuco	
-	<i>Procambarnus acutus</i>	-	Canal Mante, Tamaulipas, México	Pánuco	
-	<i>Procambarnus acantophorus</i>	-	Lagunas de Motebelo, Chiapas, México	Interior	
-	<i>Procambarnus cubensis</i>	-	Laguna Larga, Guanacabibes, Cuba	Interior	
-	<i>Procambarnus cubensis</i>	-	Entronque de herradura, Pinar del Río, Cuba	Interior	

Tabla 1. Continuación

Punto	Especie	Subgénero (Fitzpatrick, 1983)	Localidad	Cuenca	Tejido/ Voucher
-	<i>Procambarus llamas</i>	-	Guasimo, Tabasco, México	Usumacinta	-
-	<i>Procambarus clarkii</i>	-	Muzquiz, Coahuila, México	Salado	-
-	<i>Orconectes virilis</i>	-	Buenaventura, Chihuahua	Yaqui	-
-	<i>Cambarus brachydactylus</i>	-	-	-	-
-	<i>Austropotamobius italicus</i>	-	-	-	-
-	<i>Astacus astacus</i>	-	-	-	-
-	<i>Cherax destructor</i>	-	-	-	-

Dado que las filogenias son estimadas con mayor precisión mediante un muestreo taxonómico amplio, así como un muestreo extensivo de caracteres moleculares, se intentó incluir todas las especies de la subfamilia (aunque faltan 4 especies) y se colectaron datos de la secuencia de cinco regiones de genes diferentes (tres mitocondriales y dos nucleares). Se secuenciaron los genes mitocondriales 16S rARN, 12S rARN y el citocromo oxidasa subunidad I (COI). Se ha demostrado en estudios previos que estos genes brindan una adecuada señal filogenética en crustáceos (Toon *et al.*, 2009) y fueron considerados como los mejores para caracterizar la variación genética en este grupo. Fueron secuenciado adicionalmente los genes nucleares de la unidad ribosomal grande (28S) y el gen de la Histona 3 (H3), que también han mostrado algunas diferencias entre especies y que son particularmente adecuados buenos para discernir las relaciones de alto nivel (Toon *et al.*, 2009).

Las amplificaciones de PCR se hicieron utilizando cebadores específicos para cada gen (Cuadro 2) y se llevaron a cabo en 25 reacciones l con la siguiente composición: 1x tampón de PCR, 0,5 mM de cada cebador, 0,2 mM de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl₂, 1 U de Taq polimerasa (Biotools) y alrededor de 50 ng del ADN de la muestra. El perfil de térmico para las amplificaciones de PCR fue de 3 min a 94 ° C (un ciclo), 30 s a 94 ° C, 30 s en la temperatura de hibridación y 60 s a 72 ° C (30 ciclos), seguidos de una extensión final de 4 min a 72 ° C. Los productos de PCR fueron visualizados en geles de agarosa al 1,0% (1x TBE) y teñidos con SYBR-Safe (Invitrogen).

Los fragmentos fueron secuenciados en un analizador ABI 3730XL DNA Analyzer. Las secuencias de los diferentes fragmentos se alinearon usando MUSCLE (Edgar, 2004). En el caso del gen COI, se siguieron las recomendaciones para detectar la posible presencia de nmtDNA para cada secuencia. Éstas incluyen la identificación de los codones stop, la repetición de la secuencia en una proporción de las muestras, la observación de sustituciones no sinónimas y de niveles inusuales de divergencia genética en muestras de una misma población (Buhay, 2009; Song *et al.*, 2008).

4.2.2 Análisis filogenéticos

Se llevó a cabo una prueba de homogeneización en la partición de la varianza considerando la matriz de datos concatenada, usando PAUP v 4.0b10 (Swofford 2002), la cual encontró que los análisis podían llevarse a cabo con la matriz concatenada, particionando por gen y posición de codón para los fragmentos codificantes (Tabla 2).

Tabla 2. Condiciones de PCR y cebadores utilizados en este estudio para amplificar los diferentes fragmentos.

Gene region	primers	sequence	Tm(°C)	Reference
COI	COIAR	GTTGTTATAAAATTHACTGARCCT	48.5	This study
	COIBF	GCYTCTGCKATTGCYCATGCAGG	48.5	This study
	COIBR	TGCRTAAATTATACCYAAAAGTACC	48.5	This study
	COICF	ACCTGCATTTGGRATAGTATCTC	48.5	This study
	COICR	GAAWYTTYAATCACTTCTGATTTA	48.5	This study
	COIDF	CTGGRATTGTTTCATTGATTTCCT	48.5	This study
	ORCO1F	AACGCAACGATGATTTTTTCTAC	48.5	Taylor y Hardman 2002
	ORCO1R	GGAATYTCAGMGTAAGTRTG	48.5	Taylor y Hardman 2002
16S	1471	CCTGTTTANCAAAAACAT	46	Crandall y Fitzpatrick 1996
	16S-1472	AGATAGAAACCAACCTGG	46	Crandall y Fitzpatrick 1996
12S	12sf	GAAACCAGGATTAGATACCC	53	Mokady <i>et al.</i> 1994
	12sr	TTTCCCGCGAGCGACGGGCG	53	Mokady <i>et al.</i> 1994
28S	28s-rD1a	CCCSCGTAATTTAAGCATATTA	52	(Whiting, 2002; Whiting <i>et al.</i> , 1997)
	28s-rD3b	CCYTGAACGGTTTCACGTACT	52	(Whiting, 2002; Whiting <i>et al.</i> , 1997)
	28s-rD3a	AGTACGTGAAACCGTTCAGG	52	(Whiting, 2002; Whiting <i>et al.</i> , 1997)
	28s-rD4b	CCTTGGTCCGTGTTTCAAGAC	52	(Whiting, 2002; Whiting <i>et al.</i> , 1997)
	28sA	GACCCGTCTTGAAGCACG	52	(Whiting, 2002; Whiting <i>et al.</i> , 1997)
	28S B	TCGGAAGGAACCGACTAC	52	(Whiting, 2002; Whiting <i>et al.</i> , 1997)

H3	H3 AF	ATGGCTCGTACCAAGCAGACVGC	57	(Colgan <i>et al.</i> , 1998)
	H3 AR	ATATCCTTRGGCATRATRG TGAC	57	(Colgan <i>et al.</i> , 1998)

Las inferencias filogenéticas fueron llevadas a cabo con la matriz concatenada y con base en los criterios de Máxima Verosimilitud (ML) e Inferencia Bayesiana (BI). Adicionalmente se utilizaron siete especies de la familia Cambaridae como grupos externos: *Orconectes virilis*, *Cambarus brachidactylus*, *Procambarus clarkii*, *P. acantophorus*, *P. cubensis*, *P. acutus* y *P. toltecae*, dos de la familia Astacidae: *Austropotamobius italicus*, *Astacus astacus* y una de la familia Parastacidae: *Cherax destructor* (Tabla 1).

Con la finalidad de identificar el modelo evolutivo de substitución nucleotídica (Tabla 2), se consideró el Criterio de Información de Akaike corregido (AICc) y el criterio de información Bayesiana (BIC), estimados mediante el programa jModeltest (Posada, 2008). Se construyó un árbol filogenético siguiendo ML con el programa PHYML (Guindon y Gascuel, 2003) y los parámetros seleccionados por el AICc. Se evaluó la confianza en ramas por medio de 1.000 réplicas de bootstrap no paramétrico (Felsenstein, 1985).

La inferencia bayesiana de la filogenia fue implementada en el programa MrBayes v. 3.1.2 (Rönquist y Huelsenbeck, 2003), aplicando un procedimiento de búsqueda basada en la Cadena de Markov Monte Carlo (MCMC) en 10 millones de generaciones. Se utilizó un esquema de partición por codones y por gen para los fragmentos codificantes, con los parámetros recomendados por BI como asunciones previas. La convergencia entre los parámetros de diferentes corridas simultáneas (4 cadenas por corrida) fue verificada y la duración de la corrida fue ajustada de acuerdo a

la desviación estándar promedio de las frecuencias de separación, al ser éstas menores a 0.01 (Huelsenbeck y Ronquist, 2005). La frecuencia de muestreo fue de 100 generaciones. Se examinaron los resultados y se determinó la longitud del periodo de “burn-in” entendido como el conjunto de árboles previos a la estandarización del logaritmo del Likelihood y a la convergencia, con la ayuda del programa Tracer 1.4.1 (Rambaut y Drummond, 2007).

La filogenia obtenida en este estudio se comparó con la hipótesis filogenética alternativa basada en la morfología (Fitzpatrick Jr., 1983), que postula los subgéneros *Dirigicambarus*, *Pandicambarus* y *Cambarellus*. Dado que el subgénero *Cambarellus* fue recuperado como monofilético en este estudio, la monofilia de *Dirigicambarus* y *Pandicambarus* se puso a prueba con respecto a la topología obtenida en este estudio, al modificar el árbol original de ML en Mesquite (Maddison y Maddison, 2009) para producir constricciones coherente con la hipótesis morfológica alternativa. La congruencia con esta topología alternativa fue evaluada a posteriori por medio de la prueba Shimodaira-Hasegawa (SH) (Shimodaira y Hasegawa, 1999) utilizando 50.000 repeticiones de bootstrap RELI como se implementa en TreeFinder (Jobb, 2008). Además, esta topología alternativa fue probada usando un enfoque bayesiano, al encontrar el número de árboles en el conjunto de topologías de árboles de BI que mostró uno de los dos subgéneros como monofilético, lo que significaría que el análisis bayesiano no pueden excluir monofilia. Para ello, se filtraron las topologías bayesianas después del “burn-in” con la topología de restricción en el programa PAUP * (Swofford, 1998).

4.2.3 Datación de las divergencias

Con el fin de proponer un marco temporal adecuado en el que los procesos de divergencia filogenética se habrían llevado a cabo, se ha estimado la edad media de los nodos y los intervalos definidos por el 95% de la densidad posterior (HPD), utilizando métodos bayesianos de reloj molecular relajado (Drummond *et al.*, 2006), tal como se aplica en el programa BEAST ver. 1.5.3. En este método, las pruebas de hipótesis evolutivas no están condicionadas a una topología de árbol, lo que permite la evaluación simultánea de la topología y los tiempos de divergencia, incorporando un contexto metodológico de incertidumbre en ambas estimaciones. Se especificó un prior basado en un proceso “Yule” al ser éste más apropiado cuando se pretenden inferir relaciones jerárquicas y se consideró un submuestreo que incluyera representantes de cada linaje evolutivo para evitar una sobrerrepresentación de ciertos linajes con un muestreo más extensivo. Se aplicó el modelo óptimo de partición de datos y de sustitución de ADN identificado para cada gen (COI, 16S, 12S, 28S y H3) y para las posiciones de codón para el COI. Un reloj molecular relajado no correlacionado y de distribución lognormal se aplicó como modelo de variación a través de las ramas, y la pertinencia de una estimación relajada se comprobó después de verificar que la distribución del coeficiente de variación fue mayor a 1. Se utilizó un sistema de calibración basado en las tasas de mutación del COI y el 16S, ya que suele proporcionar una estimación más adecuada de las divergencias, como ha sido documentado en previos con crustáceos (Breinholt *et al.*, 2009; Porter *et al.*, 2005). Como representación de estas tasas de sustitución, se consideró un intervalo que incluyera los extremos de los valores registrados, que se extienden de 0,23 a 1,1% por millón de años (PMY) para el 16S (Cunningham *et al.*, 1992; Stillman y Reeb, 2001) y 0,7-1,3% PMY para el COI (Cook *et al.*, 2008;

Knowlton y Weigt, 1998; Knowlton *et al.*, 1993). Estos parámetros fueron introducidos como distribuciones previas uniformes, ya que no hay pruebas que justifiquen una distribución específica de las tasas en nuestros datos, evitando así la introducción de cualquier sesgo adicional a los valores de las tasas asumidos. Teniendo en cuenta la distribución geográfica del género, se incluyó también una calibración basada en información geológica, correspondiente con el levantamiento del CVT, que comenzó alrededor de hace 12 millones de años (Mya) (Ferrari *et al.*, 1999). Esta edad se fijó como máximo para el ancestro común más reciente (MRCA) de las especies mexicanas. Adicionalmente, se incluyó una calibración fósil en dos puntos, en la forma de una edad mínima y considerar tanto los fósiles más antiguos del género *Procambarus* [52,6-53,4 Mya, (Feldmann *et al.*, 1981)] como los fósiles más antiguos de cangrejos de río de Asia, *Astacus licenti* [144-159 Mya, (Van Straelen, 1928)]. Monofilia no fue asumida en ningún nodo. El análisis se ejecutó en 20 millones de generaciones con una frecuencia de muestreo de 2000 generaciones. Los parámetros de ejecución se monitorearon usando el programa Tracer ver. 1.4.1 hasta que todos los tamaños de muestra efectiva (SEE) fueron mayores de 200 así como la determinación del “burn-in” adecuado. Dos millones de generaciones fueron descartados antes de del análisis de los parámetros y cuatro corridas independientes fueron implementadas para garantizar que los valores habían convergido en estimaciones similares.

4.2.4 Patrones de diversificación en la subfamilia

Un segundo objetivo de este estudio fue describir los patrones de cladogénesis implicados en la historia evolutiva y probar si diferentes historias biogeográficas podrían dar lugar a patrones cladogenéticos contrastantes. Los cambios en las tasas de

nacimiento y muerte de linajes pueden dejar huellas distintivas en las filogenias, dando lugar a desviaciones de la linealidad en los LTT semi-logarítmicos (Harvey *et al.*, 1994; Rabosky, 2007). Se compararon las tasas de diversificación de las filogenias reconstruidas de la subfamilia entera y de los dos clados principales contenidos en ella, con respecto a diferentes modelos nulos. Para proporcionar una indicación de las tasas de diversificación en cada caso, se generó un LTT logarítmico utilizando el paquete LASER versión 2.2 (Rabosky, 2006). El LTT se generó a partir del árbol de máxima credibilidad resultado del análisis de BEAST, después de excluir los grupos externos y volver a enraizar usando TreeEdit v1.0a10 (Rambaut y Charleston, 2002). La edad de la raíz fue ajustada a la observada en los análisis de datación. Como se ha documentado previamente, eventos de extinción temprana en la historia cladogenética pueden afectar los patrones de cladogénesis en filogenias reconstruidas (Rabosky y Lovette, 2008), por lo que los LTT fueron comparados a modelos nulos de tasa de diversificación constante siguiendo diferentes escenarios de extinción (m/g = tasa de extinción, = 0; 0,2; 0,5 y 0,9; g = tasa de nacimiento, = 0,2; m = tasa de mortalidad, = variable). Estas distribuciones fueron generadas por simulaciones usando Cadenas de Markov Montecarlo con ayuda del programa Phyl-O-Gen 1.1 (Rambaut, 2002). Para tener en cuenta para el muestreo incompleto, se consideró la falta de 4 especies en este estudio, de un total de 17 especies reconocidas para la subfamilia (23,5%). 9.000 filogenias fueron generadas por cada tasa de extinción probada, para una diversidad base de 121 terminales y posteriormente podadas al azar hasta 98, reflejando nuestro muestreo.

Para probar si existía una desviación significativa de la hipótesis nula de velocidad en la tasa de cladogénesis, se comparó el valor observado de ΔAIC_{RC} de nuestros datos con los de los diferentes escenarios nulos. De esta manera, se puso a

prueba la hipótesis nula de no existencia de cambio en la tasa en comparación con la de cambio en la tasa de diversificación, usando un enfoque de ML implementado en el paquete LASER versión 2.2 (Rabosky, 2006). La prueba estadística para la constancia en la tasa de diversificación se calcula por la expresión: $\Delta AIC_{RC} = \Delta AIC_{RC} - \Delta AIC_{RV}$, donde AIC_{RC} es el valor del Criterio de Información de Akaike para el modelo que mejor se ajusta a la diversificación constante, y AIC_{RV} es el AIC para el modelo que mejor se ajusta a una tasa de diversificación variable. Por lo tanto, un valor positivo de ΔAIC_{RC} indica que los datos son mejor explicados por un modelo de tasa variable. Se probaron cuatro modelos diferentes, de los cuales dos se basan en una tasa constante y dos en una tasa variable: 1) un modelo con una tasa de nacimiento constante [el proceso de Yule, (Yule, 1925)] con un parámetro λ y μ igual a cero; 2) un modelo constante de natalidad y muerte, con dos parámetros, λ y μ ; 3) un modelo de nacimiento puro con tasa variable, donde la tasa de especiación λ_1 cambia a λ_2 en el tiempo ts , con tres parámetros (λ_1, λ_2, ts), 4) similar al modelo 3 pero con dos puntos de cambio y tres tasas de especiación diferentes (cinco parámetros).

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Filogenia

Fueron secuenciados tres fragmentos mitocondriales [16S (519 bps), 12S (365 bps) y COI (1527 bps)] y dos nucleares (28S 1100 bps y H3 322 bps), acumulando 3833 caracteres (2411 mitocondriales y 1422 nucleares). Se encontraron secuencias tipo COI (pseudogenes) en siete casos, mismos que fueron identificados por la presencia de uno o varios codones stops en la secuencia y un nivel inusual de divergencia, lo que afectaba su posición en análisis filogenéticos preliminares con respecto a individuos de la misma población. Estas secuencias fueron retiradas de la matriz del COI y por lo tanto no consideradas en ningún análisis. Como se ha reportado previamente (Buhay, 2009), cuando se trabaja con secuencias de COI en cangrejos de río tienen que ser cuidadosamente evaluadas para garantizar su homología.

El fragmento COI fue el fragmento más variable, seguido del 12S y 16S (sitios variables: COI = 530, 16S = 199, 12S = 143; sitios informativos (PI): COI = 430, 16S = 121, 12S = 80). Como esperado, los fragmentos nucleares fueron más conservativos (sitios variables para el conjunto de la información mitocondrial = 1187, PI = 783; para el conjunto nuclear, sitios variables = 244, PI = 64). Los datos combinados mostraron 1.431 sitios variables (~ 37%), y 847 PI (~ 22%).

Las topologías recuperadas por los métodos ML y BI fueron similares (Figura 3), aunque algunas discrepancias se pueden encontrar en los arreglos de algunos taxones terminales y en las relaciones entre los géneros usados como grupo externo, principalmente en relación con las posiciones de los géneros de la familia Cambaridae. Ambas topologías mostraron valores altos de soporte para un clado que contenía todos

los *Cambarellus* analizados, lo cual apoya su carácter monofilético. Dentro de este grupo se obtuvieron dos linajes divergentes que corresponden a las dos áreas geográficas del género. El Linaje I incluye las especies del grupo mexicano, coincidente con CVT de México, aunque no mostró altos valores de soporte en el análisis de ML. El Linaje II estuvo integrado por el Grupo del Golfo, que contiene las especies que se distribuyen en los Estados Unidos.

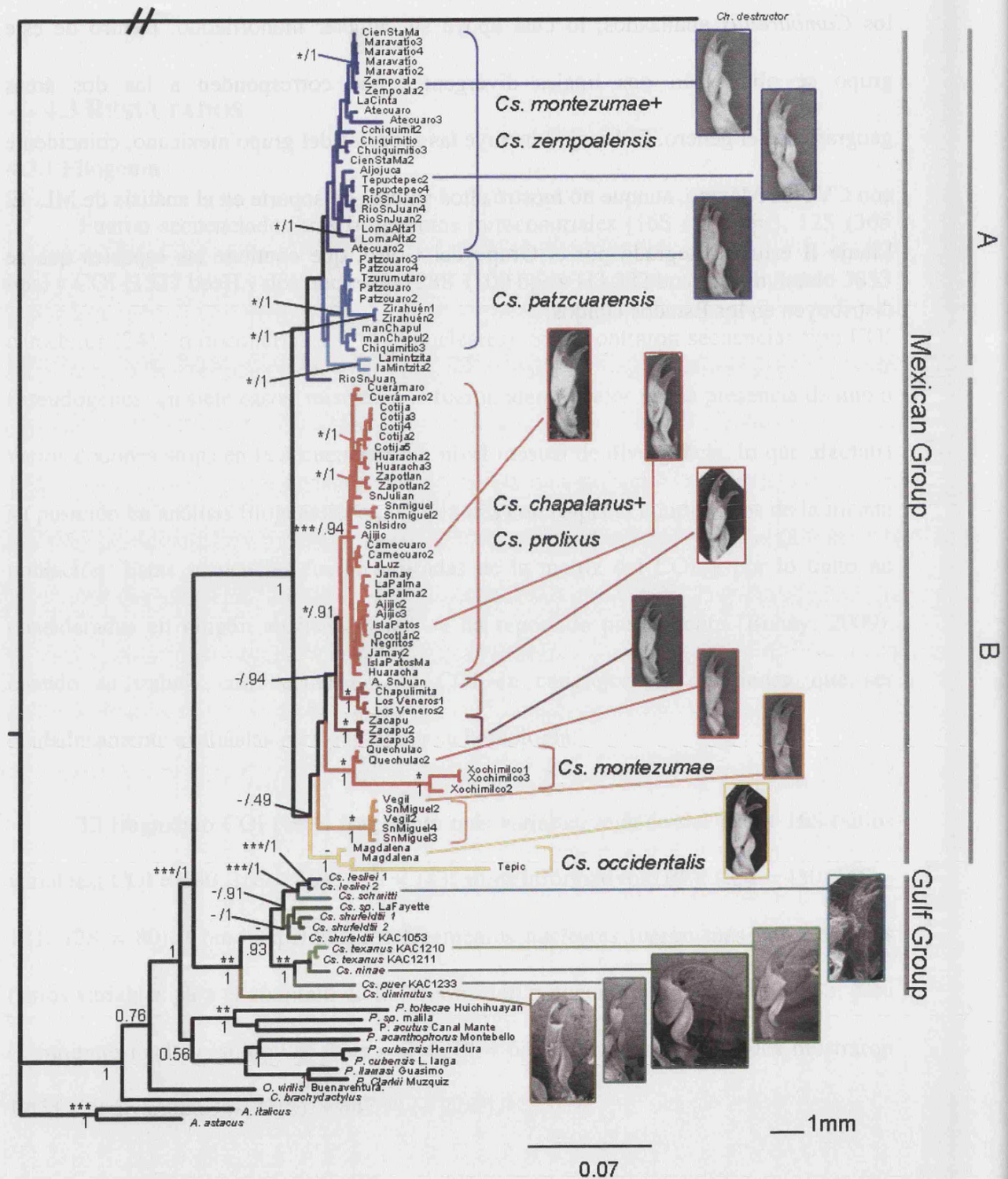


Figura. 3. Árbol filogenético de *Cambarellus* basado en tres fragmento mitocondriales y dos nucleares. Los valores de soporte se indican en cada nodo, de bootstrap (arriba) y probabilidades posteriores (debajo). * indica valores >95, ** 85-94 y *** 75-84 para los análisis de ML.

Las pruebas de topología rechazaron la hipótesis nula de una explicación igualmente posible para los topologías con y sin restricciones. La topología obtenida en este estudio mostró un valor de Likelihood significativamente mejor que el de la agrupación monofilética del subgénero *Pandicambarus*, como lo indica la prueba de Shimodaira-Hasegawa ($L = 27.483,1$ y $L = 27.546,1$, respectivamente, $P = 0,001$). Del total de 9.900 árboles, no se encontró ninguna coincidencia topológica en las búsquedas de MCMC, lo que significa que la inferencia bayesiana no apoyó la monofilia de *Pandicambarus*.

En general, las especies fueron bien recuperadas como grupos monofiléticos para la mayoría de las incluidas en el Grupo del Golfo, pero una situación diferente se presentó para el Grupo México (Figura 3). Los clados soportados por los análisis filogenéticos tienen una concordancia geográfica, apoyando la hipótesis de que los acontecimientos geográficos podrían haber sido factores importantes para la cladogénesis en el género, especialmente con respecto a las características geográficas del CVT. La estructuración filogenética entre los taxa mexicanos no apoyó la monofilia de algunas de las especies actualmente reconocidas dado que los clados bien soportados incluyeron representantes de varias especies y estas especies por tanto no formaron conjuntos monofiléticos.

Se observaron bajos niveles de divergencia con el fragmento 16S entre los taxa (Tabla 3). Las divergencias obtenidas entre los que figuran en el Linaje II fueron superiores a las del Linaje I. Las divergencias medias, considerando el modelo de ML dentro del Linaje I fue $D_{HKY} = 1.18$ y dentro del Linaje II fue $D_{HKY} = 4.13$.

Tabla 3. Distancias no corregidas (diagonal inferior) y del modelo de ML (diagonal superior) entre grupos genéticos de *Cambarellus*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	Within Group unco	Within Group HKY	
Mediolerna																									
<i>Cuitzeo</i>		0.33	0.98	1.17	0.89	2.33	1.57	2.58	1.25	12.11	11.25	10.9	10.04	11.63	11.38	13.01	15.91	18.47	18.98	23.74	31.31	50.35	0.16	0.16	
<i>Patzcuaro</i>	0.32		1.13	1.41	1.13	2.7	1.93	2.96	1.58	11.72	10.88	11.15	10.51	11.82	11.55	12.76	15.56	17.94	18.41	22.73	31.83	51.77	0.13	0.13	
<i>LaMintzila</i>	0.93	1.07		1.53	1.36	2.9	1.97	3.13	1.75	12.67	11.8	11.24	10.63	12.15	11.9	14.31	17.12	19.31	18.71	24.64	32.82	50.81	1.24	1.3	
<i>Chapala</i>	1.09	1.29	1.42		0.77	1.91	1.31	2.04	1.01	12.17	11.31	10.79	9.43	10.89	10.62	12.79	15.56	18.84	17.12	26.92	32.41	47.71	0.64	0.68	
<i>Ameca</i>	0.85	1.07	1.28	0.74		2.01	1.2	2.24	0.83	13.8	12.81	12.23	10.64	12.24	11.66	14.64	17.41	20.2	19.11	30.08	37	56.47	0.11	0.11	
<i>Zacapu</i>	2.08	2.37	2.57	1.74	1.85		1.87	1.14	1.81	12.44	11.55	11.7	10.94	12.29	11.37	14.13	17.29	20.6	18.79	29.79	32.97	51.68	0.58	0.6	
<i>Altolerma</i>	1.43	1.72	1.8	1.21	1.13	1.7		2.15	0.95	12.24	11.35	11.54	9.5	10.91	10.56	12.79	15.33	18.9	18.07	29.03	31.7	54.96	0.31	0.32	
<i>VegitSmiguel</i>	2.31	2.6	2.77	1.86	2.06	1.09	1.97		1.82	12.25	11.36	11.02	10.22	11.41	10.41	13.59	15.98	18.79	17.73	29.43	31.95	53.27	0.00	0.00	
<i>Cs.</i>																									
<i>occidentalis</i>	1.16	1.45	1.61	0.95	0.8	1.67	0.9	1.69		12.56	11.67	12.07	9.57	10.95	10.55	13.24	15.1	19.11	17.88	29.03	31.67	51.47	0.14	0.14	
<i>Cs. Lestlei</i>	8.27	8.11	8.57	8.3	9.09	8.45	8.35	8.3	8.48		0.41	3.26	2.76	3.09	3.16	4.89	9.64	12.25	13.1	20.47	19.94	54.96	0.00	0.00	
<i>Cs. Ninae</i>	7.85	7.68	8.15	7.87	8.63	8.01	7.91	7.86	8.04	0.41		2.75	2.26	2.65	2.64	4.32	8.89	11.53	12.51	19.73	20.38	53.72	0.00	0.00	
<i>Cs. schmitti</i>	7.73	7.85	7.94	7.68	8.44	8.1	8.05	7.66	8.27	2.85	2.44		3.89	4.62	4.66	6.34	10.94	14.47	15.49	20.77	22.96	60.6	0.00	0.00	
<i>Lafayette</i>	7.21	7.43	7.54	6.9	7.58	7.72	6.96	7.25	6.97	2.44	2.04	3.26		1.82	1.82	4.45	7.99	13.31	14.55	20.55	22.98	51.98	0.00	0.00	
<i>Cs. shufeldtii</i>	8.03	8.12	8.31	7.69	8.39	8.42	7.72	7.9	7.73	2.74	2.39	3.84	1.68		1.51	4.54	8.41	13.06	13.54	22.04	22.83	49.1	1.58	1.69	
<i>Cs. texanus</i>	7.91	7.99	8.19	7.55	8.11	7.99	7.53	7.41	7.5	2.79	2.36	3.85	1.67	1.42		4.8	7.42	12.11	13.25	22.08	22.22	50.69	0.85	0.88	
<i>Cs. Puer</i>	8.51	8.41	9.09	8.42	9.27	9.06	8.45	8.71	8.62	4.01	3.6	4.89	3.62	3.76	3.92		7.02	13.75	15.46	20.96	23.55	57.43	0.80	0.72	
<i>Cs. diminutus</i>	9.96	9.84	10.43	9.82	10.6	10.56	9.75	9.92	9.62	6.92	6.5	7.52	5.91	6.25	5.64	5.37		16.3	15.91	25.11	28.12	58.5	0.00	0.00	
<i>Procamburus</i>	10.78	10.61	11.15	10.92	11.42	11.57	10.95	10.89	10.99	8.48	8.11	9.42	8.87	8.86	8.39	9.05	10.04		14.51	22.17	24.81	70.44	7.31	10.84	
<i>Oreonecles</i>	11.1	10.92	11.09	10.5	11.27	11.16	10.8	10.81	10.76	8.89	8.67	9.95	9.55	9.16	9.06	9.92	10.17	9.36		20.52	20.45	49.39	0.00	0.00	
<i>Cambarus</i>	12.78	12.51	13.06	13.6	14.55	14.38	14.13	14.26	14.14	11.65	11.43	11.82	11.69	12.29	12.22	11.85	13.14	11.95	11.67		31.27	71.07	0.00	0.00	
<i>Astacidae</i>	14.69	14.8	14.99	14.91	15.92	15.16	14.85	14.89	14.73	11.59	11.78	12.61	12.55	12.54	12.32	12.79	13.94	12.84	11.56	14.83		54.2	11.04	19.66	
<i>Cherax</i>	19.53	19.73	19.63	19.16	20.55	19.73	20.18	20.07	19.78	20.05	20.01	20.81	19.69	19.31	19.47	20.42	20.86	22.25	19.3	22.3	20.09			0.00	0.00

El linaje I incluyó dos clados compuestos a su vez por varios grupos altamente soportados por los análisis de ML y BI, además de mostrar una congruencia geográfica. Se observó cierta superposición entre los dos clados, principalmente a lo largo de la cuenca del Lerma. El Clado A incluyó tres grupos, el Grupo 1, que agrupó las poblaciones de la cuenca de Cuitzeo y Medio Lerma y morfológicamente asignado a *Cs. montezumae*. *Cs. zempoalensis* de la localidad tipo se coloca dentro de este linaje. *Cs. patzcuarensis* de las cuencas de Pátzcuaro y Zirahuén conforma el Grupo 2, y fueron el clado hermano de Grupo 1. Un linaje más divergente se recuperó incluyendo a la población de La Mintzita, geográficamente cercana a la cuenca de Cuitzeo.

De forma similar, las relaciones dentro del Clado B mostraron una alta correspondencia geográfica. Varios grupos se pudieron definir, con base en el análisis de ML y BI. El Grupo 4 está conformado por las poblaciones de la cuenca de Chapala y sus afluentes (río Duero), así como sus cuencas vecinas, Cotija y Zapotlán. Este grupo figura el morfotipo asignado a *Cs. chapalanus*. *Cs. prolixus*, endémica a las condiciones de cierta profundidad del lago de Chapala figura también en este grupo. En el Grupo 5 figuran las poblaciones del río Ameca. El Grupo 6 se compuso por la población de Zacapu. El Grupo 7 incluyó las poblaciones del extremo este de la distribución del género en el CVT, con las poblaciones de Xochimilco (localidad tipo de *Cs. Montezumae*) y del lago cráter de Quechulac en la parte alta del río Lerma. El Grupo 8 se compone de dos poblaciones de la margen norte de la cuenca media del Lerma y el Grupo 9 de las poblaciones de las cuencas de los ríos Santiago y Magdalena, al oeste del CVT.

Las relaciones dentro del Clado II también muestran una estructuración que en cierta medida se corresponde con la distribución geográfica de las especies. *Cs. diminutus* constituyó el linaje más divergente, mientras que varios sub-clados se recuperaron con un alto soporte en el análisis de ML y de probabilidades posteriores con BI, estructura que se corresponde con un patrón de divergencia oeste a este. Un clado agrupa a la mayoría de las especies de las regiones Central y del Este de la Costa del Golfo (CEG), con excepción de *Cs. diminutus*, y agrupa a tres especies. Las poblaciones de *Cs. shufeldtii* de la cuenca del río Mississippi, conforman un grupo monofilético, mientras que *Cs. lesliei* y *Cs. schmitti* se agrupan en un clado hermano de éste, cobertura geográficamente cubriendo el extremo oriental de la distribución del género en el Grupo del Golfo, desde la Bahía de Mobile, Alabama hasta el río Swuanee, Florida. Un grupo similar se observa en el otro clado del Grupo del Golfo, conformado por las poblaciones de la costa oeste del Golfo (WG), donde *Cs. puer* se recuperó como un grupo hermano de *Cs. texanus* y *Cs. ninae* que se recuperan por separado.

4.3.2 Patrones de diversificación y datación

Las edades del análisis de datación se recuperaron con coherencia entre las repeticiones (Figura 4). La edad de la raíz del árbol fue de 150,9 millones de años, lo que corresponde a la separación del género *Cambaroides* proveniente de Asia del resto de grupos, lo que es coherente con su posición basal para el resto de Astacidae, como se ha observado en estudios previos (Breinholt *et al.*, 2009). El tiempo de separación para la familia Astacidae fue fechado en 110,87 millones de años (95% densidad posterior [HPD], intervalo: 82.9 - 141.5 Ma). Se estima una edad de 44,3 millones de años para el MRCA del clado que contiene a la subfamilia Cambarellinae (31,6-57,7 Ma, 95% HPD). El TMRCA de las terminales incluidas en el Grupo del Golfo fue de 25.7

millones de años (14,9 - 37,4 Ma, 95% HPD). El TMRCA de los dos linajes del Grupo del Golfo es de 16.1 millones de años (9,4 - 23,0 Ma, 95% HPD). El ancestro común más reciente del Grupo México fue fechado en 10,82 Ma (8,4 a 12 Ma, 95% HPD).

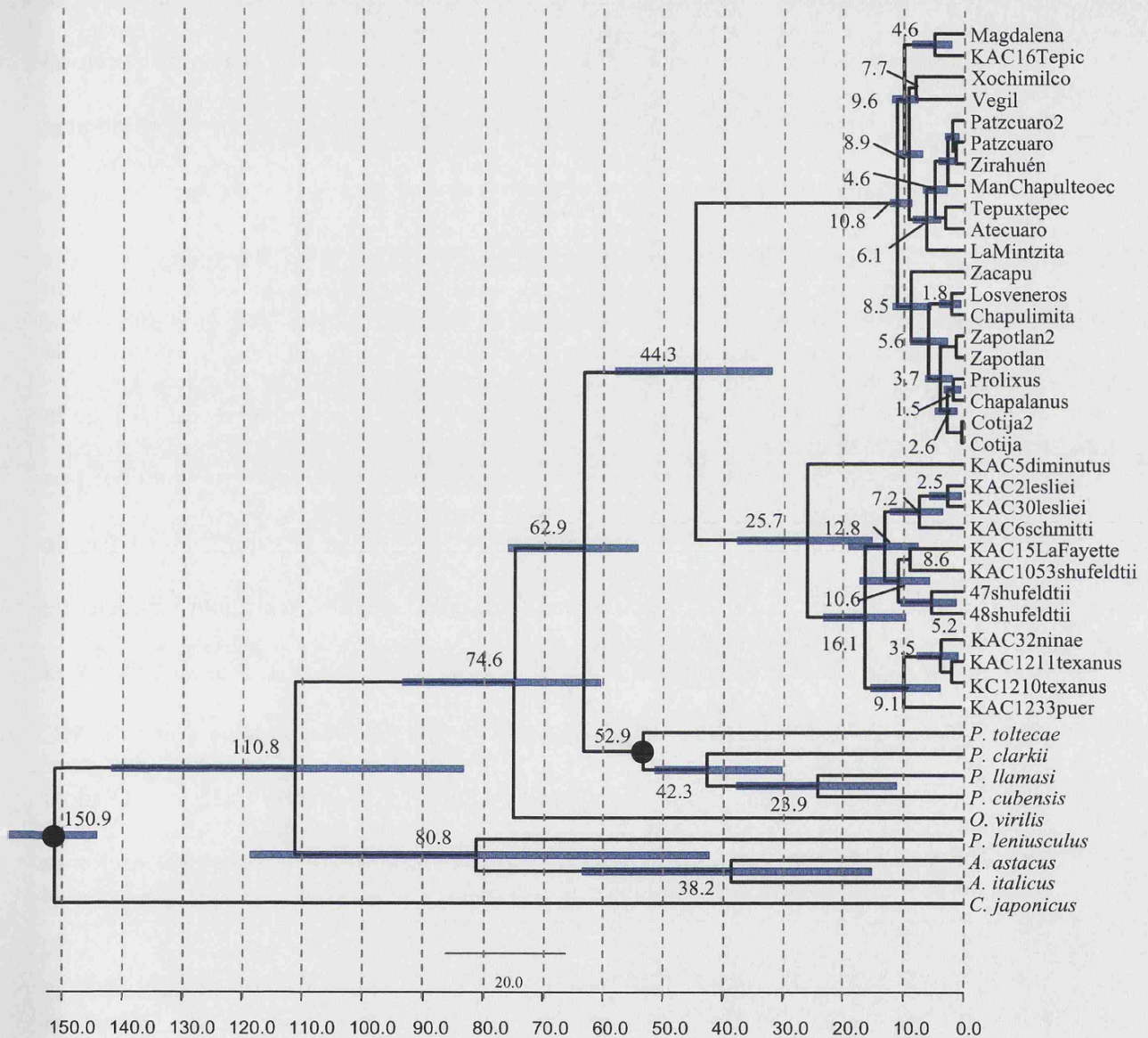


Figura. 4. Fechas de cladogénesis inferidas para la subfamilia Cambarellinae. Las edades medias se indican en cada nodo (Ma). Los puntos negros indican los nodos usados para la calibración (el fósil más antiguo de Astacidea y del género *Procambarus*).

Los valores del logaritmo del Likelihood asumiendo un reloj molecular forzado no forzado fueron -13.953 y -13.827, respectivamente. Dado que el LRT rechazó la hipótesis nula de un reloj molecular global (χ^2 252, $P = 0,001$), no se encontró evidencia que soporte que las secuencias analizadas evolucionan a un ritmo homogéneo a lo largo de todas las ramas y se procedió a utilizar un reloj molecular relajado (Figura 4). El intervalo de las tasas de sustitución para estimar las fechas de divergencia proporcionó un amplio intervalo de edades posibles, por lo que estas fechas no deben considerarse como datos puntuales.

Los gráficos de LTT muestran la acumulación temporal de los linajes en un clado e indican que la subfamilia Cambarellinae no ha seguido un modelo constante de diversificación durante su historia evolutiva, como lo muestra el análisis de LTT de la subfamilia completa (incluidos los grupos del Golfo y de México, ver Figura 5). Los modelos de LTTs de tasas de diversificación variables recibieron valores más bajas de AIC (es decir, un mejor ajuste) que el mejor modelo de tasa constante (modelo de nacimiento puro) para ambos análisis. El modelo de Yule con dos tasas distintas y el modelo de especiación dependiente de la densidad (DD) recibieron los valores de AIC más bajos entre los modelos probados para la subfamilia Cambarellinae y el Clado I respectivamente, y por lo tanto fueron seleccionados como los modelos que mejor se ajustaron a cada caso.

El análisis de LTT reveló notables diferencias entre el patrón de diversificación de la subfamilia entera y del Grupo México (Figura 5). El estadístico para la tasa de diversificación constante ΔAIC_{RC} fue de 1,148 para la subfamilia entera y 9.404 para el Grupo México, lo que indica que los datos se ajustaron mejor a un modelo de tasa de diversificación variable en ambos casos. Las pruebas de bondad de ajuste indicaron que

el valor medio del LTT Bayesiano de la subfamilia Cambarellinae no fue significativamente diferente del esperado en ninguno de los modelos de diversificación constante simulados, asumiendo tasas de extinción de 0; 0,2; 0,5 y 0,9 ($P = 0,253$; 0,163; 0,110 y 0,090 respectivamente). Sin embargo, el valor del LTT del Grupo México fue significativamente mayor que el valor crítico encontrado en los diferentes modelos de simulación de tasa constante considerando un muestreo incompleto (para las tasas de extinción = 0; 0,2; 0,5 y 0,9 se obtuvieron los valores de $P = 0$; 0,109; 0,003; <0,000 y <0,000, respectivamente). Estos resultados se pueden interpretar como evidencia de que hay una señal de la diversificación bajo el modelo de DD de especiación para el Grupo México.

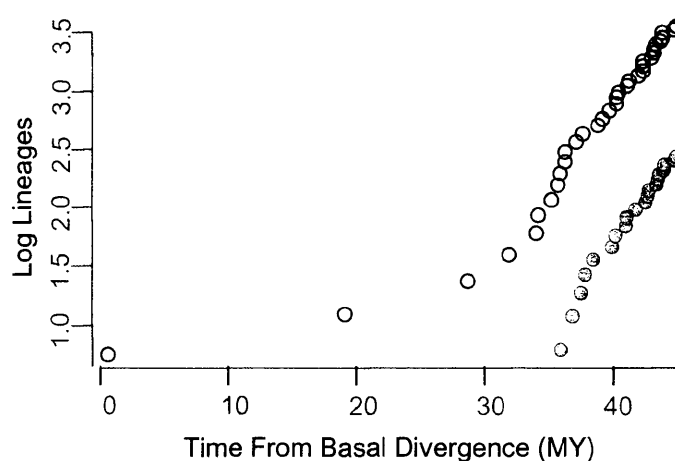


Figura 5. LTT de la familia Cambarellinae (círculos abiertos) y del linaje I (círculos en gris). La escala del LTT se muestra invertida, ya que cuenta el tiempo transcurrido desde el MRCA de la subfamilia.

4.4 DISCUSIÓN

4.4.1 Relaciones filogenéticas

El estudio molecular de la subfamilia Cambarellinae ha corroborado su monofilia, previamente propuesta por la evidencia morfológica (Fitzpatrick Jr, 1983). La combinación de marcadores mitocondriales y nucleares proporcionaron la información necesaria para resolver las relaciones entre los clados con alto soporte, llamados aquí el Grupo del Golfo y el Grupo México, así como clados y subgrupos incluidos (ver Figura 3). Una menor resolución se observa en la base del Grupo México, donde varios clados no recibieron soporte para todos los análisis. Esta politomía podría deberse a la falta de resolución en la base de este linaje, y puede ser explicado por un muestreo inadecuado o una desviación en la composición de las bases nitrogenadas (Walsh *et al.*, 1999). También es posible, que dicho patrón pueda estar relacionado con las características evolutivas del grupo, como una aceleración de las tasas de especiación en cortos periodos de tiempo (Slowinski, 2001). El muestreo de especies en este estudio no es completo, y cuatro especies todavía no se han añadido al análisis filogenético. En cuanto al Grupo del Golfo, *Cs. blacki*, rara vez ha sido colectado y no pudo ser amplificado a partir del tejido de museo disponible. Del Grupo México, *Cs. chihuahuae*, *Cs. areolatus* y *Cs. alvarezi* casi no tienen registros de la colección y sus poblaciones se encuentran actualmente en grave peligro o posiblemente extintas, ya que no se encontraron individuos en los intentos de colecta llevados a cabo, situación posiblemente debida a una desecación completa del hábitat o su alteración, alteraciones reportadas anteriormente (Contreras-Balderas y Lozano-Vilano, 1996; Rodríguez-Almaraz y Campos, 1994). Su inclusión podría proporcionar información valiosa sobre

las relaciones filogenéticas dentro de la subfamilia, especialmente entre los dos Grupos Geográficos y filogenéticos definidos en este estudio.

Varias diferencias se pueden encontrar entre las relaciones filogenéticas observadas en este trabajo y las de la hipótesis previa (Fitzpatrick Jr, 1983). Numerosos conceptos de especies han sido propuestos y cada uno enfatiza diferentes aspectos para la delimitación de las especies. Esto ha llevado a conclusiones diferentes sobre sus límites y el número de especies reconocidas en muchos grupos. Un “concepto unificado de especie” da especial importancia a un elemento común encontrado en muchos otros, que es la separación de especies por linajes evolutivos distintos (De Queiroz, 2007). Este concepto unificado también permite el uso de diversas líneas de evidencia para probar los límites de las especies [por ejemplo, monofilia en uno o varios loci de ADN, distinción morfológica o ecológica, etc. (De Queiroz, 2007; Sites Jr. y Marshall, 2004)] y es el concepto de especie que seguimos en este estudio.

En primer lugar, las relaciones entre las especies del Grupo del Golfo no son congruentes con varias de las hipótesis basadas en morfología. Aunque las especies generalmente son bien recuperadas como monofiléticas, sus relaciones no son congruentes. Como se desprende de las pruebas de topología realizadas en este estudio, la monofilia de los dos subgéneros del Grupo del Golfo no se ha corroborado. En vez de ello, el subgénero *Dirigicambarus* (compuesto por *Cs. shufeldtii*) se recupera como un grupo hermano de un clado que contiene a *Cs. lesliei* y *Cs. schmitti*. Esto dejaría al subgénero *Pandicambarus* como parafilético, en última instancia cuestionando su validez. El mantenimiento del subgénero *Dirigicambarus* para *Cs. shufeldtii* también podría ser cuestionada, ya que no hay pruebas filogenéticas y de divergencia que le de soporte, señalando que la distintiva morfología genital en esta especie podría ser el

resultado de procesos de deriva o selección. Un punto en común es la consideración de *Cs. shufeldtii* como poseedora de caracteres derivados en lugar de un representante de estados plesiomórficos. Los resultados filogenéticos en este trabajo también están de acuerdo con la posición de *Cs. diminutus*, que muestra estados de carácter plesiomórficos para el Grupo del Golfo. La anterior propuesta respecto a sus características morfológicas singulares (mencionadas en Fitzpatrick Jr, 1983) es coherente con la hipótesis filogenética de este estudio.

La estructura filogenética tiene una correspondencia geográfica para el Grupo México. Dos clados diferentes se pueden encontrar dentro de este grupo con cierto grado de superposición geográfica, principalmente a lo largo de la cuenca del río Lerma, centro de México. El Clado A contiene las poblaciones de la parte media del Río Lerma, diferentes cuencas lacustres cerradas y la cuenca del Lago de Cuitzeo (Tabla 1, Figura 1), mientras que algunos grupos se identifican en el Clado B, conformado por varias poblaciones de la cuenca baja y media del Lerma y cuencas vecinas. Este patrón podría ser el resultado de diferentes historias demográficas recientes en ambos linajes.

La observación de una estructuración geográfica de los clados apoya la hipótesis de que la cladogénesis en el grupo se ha visto influida por la historia geológica. Esta es posiblemente la razón por la cual algunas especies reconocidas no se recuperan como monofiléticas, tal es el caso de *Cs. montezumae*, *Cs. zempoalensis* y *Cs. prolixus*, citadas en varias cuencas fluviales, o en simpatría con sus parientes más cercanos. *Cs. montezumae* fue asignado aquí en el grupo 7, en el Clado B, donde figuran poblaciones cerca de la localidad tipo y de la misma cuenca (Xochimilco, Valle de México), incluida la población más oriental de género en la CVT, el lago del cráter de Quechulac. Otras poblaciones morfológicamente asignadas a *Cs. montezumae* procedentes de la cuenca de

Cuitzeo y Medio Lerma se concentran en el Clado A y forman un grupo parafilético y heterogéneo. Dado que *Cs. zempoalensis* se recupera dentro de este grupo, estos resultados no están de acuerdo con la idea de que los sistemas de Zempoala y el Valle de México debe ser considerado regiones altamente similares (Doadrio y Domínguez, 2004), y es congruente con un escenario resultante de cierto grado de aislamiento anterior en la historia de la frontera de alto Lerma-Balsas. *Cs. prolixus* se incluyó dentro de la mayor variación genética de *Cs. chapalanus*, y los análisis filogenéticos no apoyan su consideración como una especie diferente. Sin embargo, la distintiva morfología de *Cs. prolixus* sugiere un proceso muy reciente de la divergencia entre esta especie y *Cs. chapalanus* que puede no estar siendo detectado por los marcadores genéticos utilizado aquí (ver Crandall *et al.*, 2000, respecto al debate sobre la importancia relativa de los marcadores genéticos neutrales frente a las diferencias morfológicas seleccionadas en estudios de especies).

Un aumento en la tasa de especiación, tal como el que a menudo se asocia a la primera etapa de una radiación adaptativa, se espera que resulte en un aumento repentino significativo en la tasa de diversificación (Crisp *et al.*, 2004; Rabosky, 2007; Turgeon *et al.*, 2005). En este estudio se observa una desviación significativa frente a un modelo constante de la tasa de especiación en el Grupo México. Este patrón de radiación coincide temporalmente con la formación del CVT, una región geológica que se ha propuesto, ha afectado la cladogénesis de grupos muy diferentes de organismos dulceacuícolas (Mateos *et al.*, 2002; Ornelas-García *et al.*, 2008). Los patrones de especiación en *Cambarellus* parecen estar estrechamente relacionadas a su formación, así como a los fenómenos climáticos en el centro de México, y la mayoría de las cladogénesis parecen ser el resultado de los eventos vicariantes.

Las razones para el aumento observado en la tasa de especiación en el Grupo México pueden estar relacionadas al desarrollo de una de las grandes cadenas de montañas subtropicales del mundo, limitado por tres cordilleras volcánicas (NE: Sierra Madre Oriental; NW: Sierra Madre Occidental; y S: CVT), que ha influido en muchos patrones cladogenético y por lo tanto, en las distribuciones de organismos de agua dulce (Miller y Smith, 1986a). Esta compleja historia geológica es el resultado de acontecimientos orogénicos acaecidos en la región desde el Mioceno (Ferrari *et al.*, 2000b) y se puede asociar con capturas de ríos, formación de las cuencas endorreicas y otras modificaciones en las cuencas que probablemente han permitido la dispersión y ha resultado en el aislamiento y la especiación de un número de los grupos de agua dulce de México (Barbour, 1973a; Barbour, 1973b; Doadrio y Domínguez, 2004; Echelle *et al.*, 2005b; Webb *et al.*, 2004). Todas estas líneas de evidencia geológica indican que el intervalo geográfico histórico de Cambarellinae en México y el sureste de los Estados Unidos ha cambiado drásticamente con el tiempo. Aunque las capas de hielo continental durante la glaciación del Pleistoceno en América del Norte nunca se extendieron a la zona de estudio, estas glaciaciones pudieron tener profundos efectos indirectos en las faunas de agua dulce en México y son la hipótesis han permitido la dispersión por medio de capturas de río, inundaciones locales interiores, han conectado diferentes cuencas debido a la disminución del nivel del mar durante el Neogeno superior (Conner y Suttkus, 1986). Si se asume que las preferencias de hábitat y las tolerancias ambientales de las especies de Cambarellinae han diferido poco en el tiempo, podemos esperar que sus vías de dispersión han estado limitadas (en comparación con otros grupos como el género *Procambarus*, más asociados a hábitats de arroyos o de ríos) a hábitats lacustres o ambientes lénticos, que han sido objeto de grandes cambios debido a las oscilaciones climáticas.

4.4.2 Biogeografía y patrones cladogenéticos

Uno de los problemas de los estudios biogeográficos y de especiación es que la distribución actual de las especies puede no ser necesariamente un indicador fiable de los intervalos de distribución históricos (Losos y Glor, 2003). Nuestros resultados filogenéticos y de datación apoyan la hipótesis biogeográfica a gran escala propuesta para la fauna de cambáridos. En ésta, la parte sureste de los Estados Unidos se postula como centro de origen y diversificación de la familia en América del Norte (Hobbs, 1969, 1981). Considerando esto junto con la variación morfológica observada, se ha postulado un origen para la subfamilia en la parte sureste de los Estados Unidos (Fitzpatrick Jr, 1983), concretamente un ancestro proto-Cambarellinae se encontraría en algún lugar de la parte baja del presente río Mississippi, antes del Mioceno. Debido a la edad de la división geográfica entre ambos grupos y a la complejidad que la historia orogénica del sudeste de América del Norte ha experimentado desde entonces, muy posiblemente la asignación de una distribución ancestral del MRCA de Cambarellinae no sería exacta. Sin embargo, sobre la base de la estructura cladogenética observada, parece razonable postular una zona situada en la actual parte occidental del Golfo, posiblemente asociadas a las tierras altas del sistema orográfico Ouachita, entonces ya formada. Esta hipótesis tendría que permitir el acceso posterior a la región que posteriormente diera lugar al sur de las Planicies Altas del Sur, desde donde una conexión histórica se ha observado con la parte norte de la meseta central de México, que es la parte sur de Sistema “Range y Basin System”(Miller y Smith, 1986b; Schönhuth *et al.*, 2008).

Nuestros resultados muestra que el MRCA para Cambarellinae existió en el Eoceno, Mya \sim 44,3 (31,2 - 57,74 Ma). Un acontecimiento biogeográfico singular

puede deducirse de este estudio, relacionado con la separación de ambos Grupos, lo que podría estar relacionado con el límite Eoceno-Oligoceno, una transición que se ha documentado afectó fuertemente a los habitantes terrestres, marinos y de agua dulce, como lo demuestran las extinciones significativas y modificaciones en la estructura en una amplia gama de grupos, documentadas en el registro fósil (McKinney *et al.*, 1992; Thomas, 1992). Estos eventos cladogenéticos se han asociado a una época de cambio climático global relacionado con el fuerte aumento en las temperaturas que presumiblemente podría afectar a la diversificación de linajes en los grupos de agua dulce, como la familia de peces Centrarchidae (Cerca *et al.*, 2005). Además, este evento parece coherente con el patrón de extinción y nacimiento de linajes visto en el norte de registro fósil de los peces de agua dulce de América (Cavender, 1986). En este caso, la formación de la Falla de Río Grande podría tener efectos vicariantes de los antepasados de ambos Grupos.

Como resultado de este estudio, es posible postular que los acontecimientos vicariantes que con posterioridad se dieron en ambos Grupos, se relacionaron con el cambio en las barreras geográficas y del clima, mientras que los eventos de dispersión de algunas especies son responsables de las distribuciones más amplias observadas en la actualidad, mientras que los espacios no ocupados hoy en día, estarían relacionados con períodos de extinción. Si bien estos eventos biogeográficos están presentes en ambos Grupos, los escenarios propuestos son contrastantes y aquí se explican algunas de sus posibilidades, inferidas a partir de la congruencia en el tiempo de eventos cladogenéticos.

Las cladogénesis de las especies en cada componente geográfico se explican mejor por un mecanismo de especiación alopátrica, porque no se observa superposición

entre taxa hermanos en *Cambarellus* (Barraclough y Vogler, 2000). La estimación de los tiempos de divergencia proporciona un escenario temporal para estos eventos, lo que permite relacionar la historia de la tierra con los mecanismos vicariantes propuestos para promover especiación alopátrica. Como se observa, los patrones de divergencia en ambos grupos geográficos son contrastantes en varios aspectos. En primer lugar, las estimaciones de datación muestran una diversificación más antigua en el Grupo del Golfo que en el Grupo México, aunque, dado que posibles eventos relacionados con la diversificación de las especies del norte de México no pudieron estudiarse, no se excluye que éstos hayan podido ser anteriores a los observados para el Grupo México. En segundo lugar, mientras que para la cladogénesis del Grupo del Golfo podría ser más importantes las oscilaciones climáticas, las modificaciones orogénicas lo parecen haber sido para la diversificación de las especies en el Grupo México. La ausencia de *Cambarellus* de la cuenca del Río Grande podría explicarse por la extinción generalizada de sus poblaciones relacionada con la alta tasa de desecación desde la época Terciaria (Miller y Smith, 1986b), última evidencia de dicha distribución sería la presencia de *Cs. chihuahuae* en la cuenca de Guzmán, en la parte sur de la Falla de Río Grande, un componente clave en la distribución actual de la subfamilia.

El evento que por primera vez afectó la diversificación del Grupo del Golfo fue fechado en el límite Oligoceno-Mioceno, ~ 25,7 Mya (14,95 - 37,38 millones de años), y correspondió a la separación del linaje de *Cs. diminutus*. Es posible que los eventos de extinción puedan explicar la observación de una rama única y diferenciada que lleva a *Cs. diminutus*, aunque es posible que exista variación genética no muestreada de este linaje, lo que sería coherente con la amplia variación morfológica observada en los escasos individuos colectados y asignados a la especie previamente (Fitzpatrick Jr, 1983). La siguiente cladogénesis observada en el Grupo del Golfo es congruente con

los eventos tempranos del Mioceno, aproximadamente hace 16,1 Ma (9,42 a 23,0 Ma), dando lugar a los grupos de especies del Oeste (WG) y de la Costa Este del Golfo (EG). La actividad orogénica que data de este período corresponde en el sureste de Estados Unidos con la formación de la meseta de Edwards, y el aumento de la actividad a lo largo de la Falla Balcones durante el Mioceno.

Los eventos de especiación posteriores pueden correlacionarse con los niveles del mar a lo largo de la costa del Golfo, que han sido fuertemente modificados por oscilaciones climáticas desde la época del Mioceno. Un período importante para la especiación de las especies de *Cambarellus* podría estar relacionado con el Mioceno Medio [hace 11,0-16,5 Ma (Berggren *et al.*, 1995)], cuando se observaron ocasiones de cladogénesis dentro de los grupos de especies en el Grupo del Golfo. Este periodo se caracterizó por un aumento dramático en el nivel del mar entre 80 y 100 m sobre el nivel del mar actual (Haq *et al.*, 1987; Riggs, 1984). Como consecuencia, una incursión del mar se registró a lo largo de la costa del Golfo de México, que podría haber sido importante en la división de las especies de Occidente y Central-Oriental y mantenerlos separados lo suficiente como para representar un evento de especiación.

Posteriormente, en el Mioceno tardío se produjo un fuerte descenso de 80 a 100 m en los niveles del mar, por debajo del nivel del nivel actual, extendiendo el alcance de los ríos tributarios del Golfo de México más al sur. Esta extensión pudo haber creado conexiones entre afluentes que posteriormente quedaron aislados, durante los períodos de mayor nivel del mar. La disminución en el nivel del mar durante el Mioceno Tardío se correlaciona con la edad estimada de los eventos finales de especiación entre las especies existentes en *Cambarellus*. El Plioceno (2.5 - 5.5 millones de años) se caracterizó por una elevación de 50 - 80 m sobre el nivel del mar actual, pero esta

incursión duró sólo un tiempo corto, aproximadamente un millón de años (Riggs, 1984). Los niveles del mar se redujeron durante el Plioceno Tardío, y durante el Pleistoceno hubo por lo menos tres grandes fluctuaciones en el nivel del mar, aunque el aumento no fue superior a 10-20 m sobre el nivel actual (Riggs, 1984; Swift *et al*, 1986). Todos estos acontecimientos podrían afectar a la especiación y la posible reconexión entre cuencas entre las especies del Golfo de *Cambarellus*.

Dado que la forma generalizada de vida en la subfamilia es la de habitante de hábitats lénticos, es razonable pensar que esta podría ser la misma situación de los antepasados de los diferentes grupos. En este caso, la formación de paleolagos durante el Mioceno tardío (~ 10,8 Ma) a lo largo de la Meseta Central del Norte de México y sueste de los Estados Unidos podrían ser características importantes para las cladogénesis observadas en el Grupo México. Además, eventos geológicos durante el Mioceno medio podría haber influido, tales como el levantamiento de la parte occidental de la Meseta Central. Este levantamiento fue promovido por la actividad tectónica en la región y se relacionó con la apertura del Proto-Golfo de California durante el Mioceno inferior y medio (Henry y Aranda-Gómez, 2000).

El patrón de distribución observado en *Cambarellus* está de acuerdo con hipótesis propuestas para otros organismos de agua dulce, como el llamado “Plateau Track” y el “Western Mountain Track” (Miller y Smith, 1986b). Para explicar distribuciones similares en géneros de peces como *Ictalurus*, *Moxostoma* y *Micropterus*, estos patrones sugieren intercambios hidrográficos a través de la árida meseta presente en el norte de México. Con base en la composición faunística y el hallazgo de taxa hermanos entre las regiones como lo son los pares *Tampichthys* / *Codoma* y *Algansea* / *Agosia* (Schönhuth *et al.*, 2008), se han sugerido posibles conexiones entre las cuencas

del suroeste de la vertiente del Golfo (ríos Nueces, Colorado y Guadalupe) y aquellas de afluentes del norte del Río Grande (Smith y Miller, 1986). Estas conexiones pueden explicar la presencia de las especies del norte de la Meseta Central (*Cs. alvarezi*, *Cs. areolatus* y *Cs. chihuahuae*), especialmente relacionadas con hábitats lacustres. Se ha documentado la existencia de lagos extensos asociados al Río Grande, que cubrían gran parte del noroeste de Chihuahua y el sur de Nuevo México en el Pleistoceno (Burrows, 1910; Lee, 1907) y se han relacionado con la gran diversidad de especies de peces de agua dulce de la región (Echelle y Echelle, 1998; Edwards, 2001; Garrett *et al.*, 2005).

Por ejemplo, se ha propuesto la existencia de un lago cuaternario al oeste de Chihuahua (Lago Cabeza de Vaca) que recibía al Río Grande en tiempos tan recientes como hace 320.000 años (Reeves Jr, 1965). La reducción en el volumen de los hábitats lacustres en la Meseta Central por fenómenos climáticos pudo tener como resultado una alta tasa de extinción a finales del Cenozoico (Miller y Smith, 1986b), y pudo resultar en el patrón de distribución parchada de *Cambarellus* en esta región. De hecho, *Cs. alvarezi*, *Cs. areolatus* y *Cs. chihuahuae*, hoy en día posiblemente se han extinguido, dado que durante los esfuerzos de muestreo para este estudio se observaron sus hábitats secos o ausentes y ningún individuo fue observado. Se piensa que el hábitat de *C. alvarezi* se mantiene sin agua desde 1995 (Contreras-Balderas y Lozano Vilano, 1996). Una situación similar es la de *Cs. chihuahuae*, limitado a cuatro manantiales pequeños y aislados del desierto de Chihuahua, y que no ha sido registrada (Fernando Álvarez, com.pers.) y *Cs. areolatus*, de la cuenca de Parras, Coahuila, que se encuentra en un avanzado proceso de desertificación (Contreras-Balderas *et al.*, 2002). Esta alta tasa de desecación, hoy en día agravada por la actividad humana podría haber erosionado la diversidad en esta región, conduciendo a la extinción a la mayoría de las poblaciones de *Cambarellus* en el norte de la Meseta Central de México, y también podría explicar la

ausencia actual de *Cambarellus* de los ríos al sur de las cuencas de la Costa del Golfo de Estados Unidos.

La distribución de *Cambarellus* en la parte norte de la Meseta Central es coherente con la hipótesis argumentando las poblaciones actuales están aisladas en grandes regiones áridas o semiáridas a consecuencia de la extirpación parcial de un intervalo continuo anterior, y su condición actual es debida al aumento en la tasa de desecación durante la era terciaria, como lo demuestran los análisis filogenéticos y de fauna en grupos diferentes de peces con una distribución similar como la familia Goodeidae (Doadrio y Domínguez, 2004;. Webb *et al*, 2004) y algunos géneros de Cyprinodontidae (Echelle *et al*, 2005a). Además, y continuando hacia el sur, posibles conexiones entre ríos del norte y el occidente de la Meseta Central podrían explicar la presencia de *Cs. occidentalis* en la cuenca del Bajo Santiago.

El sistema Lerma-Santiago es la principal cuenca que fluye a lo largo de CVT. Anteriores conexiones entre el río Lerma y drenajes del noreste y el oeste se han sugerido para la familia Goodeidae y otros grupos de peces (Doadrio y Domínguez Domínguez, 2004; Domínguez-Domínguez *et al*, 2006; Miller y Smith, 1986b; Schönhuth *et al*, 2008).

Un patrón de diversificación de diferentes grupos de agua dulce en el centro de México, se ha observado, como en la subfamilia Goodeinae y los géneros *Notropis* y *Algansea*. Estas hipótesis sugieren una antigua y sucesiva fragmentación de la cuenca Lerma-Santiago a través de grandes sistemas lacustres desde el Mioceno hasta Pleistoceno (Gesundheit y García, 2005; Miller y Smith, 1986b), esta fragmentación ejercería una gran influencia en la diversificación de las familias de peces Goodeidae y

Atherinidae (Barbour, 1973a; Doadrio y Domínguez-Domínguez, 2004; Webb *et al.*, 2004).

La evidencia molecular presentada aquí indica que el patrón de radiación observado en el Grupo México podría estar relacionado en algún grado a la formación del CVT. La separación de los clados principales de *Cambarellus* en esta región fue datada a finales del Mioceno y en el Plioceno (10.8 - 4.6 Ma), un período de gran actividad geológica en el centro de México (Ferrari *et al.*, 2000b). La formación del CVT se dio en dirección oeste-este (Ferrari, 2000), y esto es coherente con la separación de los principales grupos de *Cambarellus* a lo largo de CVT, como se ha observado para otros grupos de agua dulce. Su formación pudo haber comenzado entonces, dado que *Cambarellus* no está presente en las cuencas del Pacífico del CVT, al sur del río Ameca.

La mayor diversificación del género tuvo lugar en un intervalo de tiempo de menos de nueve Ma. Las cladogénesis tempranas del grupo contienen poblaciones de la parte baja del río Santiago en la parte oeste del CVT, fechado aquí en torno a 9,6 Ma (7.45 - 11.2 Ma, 95% HPD), lo que es coincidente con la formación de la formación del Río Santiago (Ferrari *et al.*, 2000a). Más tarde, la división de los grupos de la cuenca de Santiago y Magdalena se estimó en 4.6 Ma y podría estar relacionada con la formación del Cañón de Santiago, a consecuencia de la formación de la falla de Santa Rosa, fechada a principios del Plioceno (Ferrari y Rosas-Elguera, 1999).

El MRCA de un linaje de la cuenca alta Lerma, conformado por las poblaciones identificadas como *Cs. montezumae* fue fechado en torno a 8,9 Mya, lo que podría ser debido a la formación de una cuenca en la antigua cuenca superior del río Lerma, que habría estado separada del resto el tiempo suficiente para permitir la divergencia entre

linajes. La evidencia de su diferenciación ha sido sugerido por patrones comunes en grupos diferentes de fauna de agua dulce (Doadrio y Domínguez, 2004; Domínguez-Domínguez *et al.*, 2006). Eventos posteriores podrían conducir a la división entre las poblaciones de la cuenca del río la Laja (~ 7,7 millones de años) del linaje que llevó a los taxa del Alto Lerma, el Valle de México y los lagos cráter. Estos eventos cladogenéticos serían coherentes con que los fenómenos climáticos a lo largo de CVT se relacionaron con la cladogénesis de *Cambarellus* en el Grupo México.

Similares eventos climáticos podrían haber afectado la separación del grupo que contiene las poblaciones de la laguna de Zacapu. Como se informó en los registros estratigráficos, esta laguna fue una vez un sistema más grande, de forma que hoy en día resta sólo una parte de ella, dando lugar a una composición singular de fauna (Domínguez-Domínguez *et al.*, 2006). La separación de esta población del resto de la cuenca baja del Lerma, datada alrededor de 8,5 Ma, podría estar relacionada con su separación debido a la formación del Escudo del Corredor Tarasco, a finales del Plioceno-Mioceno Temprano (Israde-Alcántara y Garduño-Monroy, 1999).

El aislamiento del río Ameca podría llevar a la separación entre las poblaciones del río Ameca y el MRCA de los miembros de las cuencas Chapala / bajo Lerma *Cs. chapalanus* y *Cs. prolixus*, en el límite entre Mioceno y Plioceno, hace aproximadamente 5.6 Ma (2,61-8,66 Ma). Esta observación es coherente con una conexión entre el río Ameca y el sistema Chapala-Bajo Lerma, que fue interrumpida por la actividad geológica a lo largo del Ameca y la Falla de San Marcos, que ocurrió durante el Plioceno temprano (Ferrari y Rosas-Elguera, 1999).

Los acontecimientos que condujeron a la separación de las poblaciones de las cuencas de Pátzcuaro y Zirahuén de las del MRCA de las cuencas de Cuitzeo / Medio Lerma datan de mediados del Plioceno, unos 4.6 Ma (2,66 - 6,60 Ma). Esto resulta en una separación del sistema lacustre de Pátzcuaro del sistema del río Lerma durante Plioceno superior, aunque el tiempo para la formación del lago de Pátzcuaro sigue aún objeto de debate. La formación del Corredor Tarasco se ha propuesto como determinante en la diversificación de las especies de agua dulce en la región desde mediados del Plioceno (Israde-Alcántara y Garduño-Monroy, 1999).

REFERENCIAS

- Barbour, C.D., 1973a. A biogeographical history of *Chirostoma* (Pisces:Atherinidae): a species flock from the Mexican Plateau. *Copeia* 1973, 553-556.
- Barbour, C.D., 1973b. The systematics and evolution of the genus *Chirostoma* Swanson (Pisces: Atherinidae). *Tulane Studies in Zoology and Botany* 18, 97-141.
- Barracough, T., Vogler, A., 2000. Detecting the geographical pattern of speciation from species level phylogenies. *Am Nat* 155, 419-434.
- Berggren, W., Kent, D., Swisher, C., Aubry, M.-P., 1995. A revised Cenozoic geochronology and chronostratigraphy. In: WA Berggren, DV Kent, MP Aubry, Hardenbol, J. (Eds.), *Geochronology, time scales and global stratigraphic correlation*, Tulsa, OK, pp. 129-212.
- Breinholt, J., Perez-Losada M., Crandall, K.A., 2009. The timing of the diversification of the Freshwater Crayfishes. In: Martin, J.W., Crandall, K.A., Felder, D.L. (Eds.), *Decapod Crustacean Phylogenetics*. Taylor and Francis Group, LLC, Boca Raton, FL, pp. 343-356.
- Buhay, J.E., 2009. COI-like" Sequences are Becoming Problematic in Molecular Systematic and DNA Barcoding Studies. *Journal of Crustacean Biology* 29, 96-110.
- Burrows, R., 1910. Geology of northern Mexico. *Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana* 7, 85-103.
- Cavender, T.M., 1986. Review of the fossil history of North American freshwater fishes. In: Wiley, C.H.H.a.E.O. (Ed.), *The zoogeography of North American freshwater fishes*. John Wiley & Sons, New York, pp. 699-724.
- Colgan, D.J., McLauchlan, A., Wilson, G.D.F., Livingston, S.P., Edgecombe, G.D., Macaranas, J., Cassis, G., Gray, M.R., 1998. Histone H3 and U2 snRNA DNA sequences and arthropod molecular evolution. *Aust. J. Zool* 46, 419-437.
- Conner, J., Suttkus, R., 1986. Zoogeography of freshwater fishes of the western Gulf Slope of North America. *The zoogeography of North American freshwater fishes*: New York, John Wiley and Sons, 413-456.
- Contreras-Balderas, S., Almada-Villela, P., de Lourdes Lozano-Vilano, M., García-Ramírez, M., 2002. Freshwater fish at risk or extinct in México. *Rev. Fish Biol. Fish.* 12, 241-251.

- Contreras-Balderas, S., Lozano-Vilano, M., 1996. Extinction of most Sandia and Potosi valleys(Nuevo Leon, Mexico) endemic pupfishes, crayfishes and snails. Ichthyological exploration of freshwaters. Munchen 7, 33-40.
- Cook, B.D., Pringle, C.M., Hughes, J.M., 2008. Phylogeography of an Island Endemic, the Puerto Rican Freshwater Crab (*Epilobocera sinuatifrons*). J Hered, esm126.
- Crandall, K.A., Bininda-Emonds, O.R.P., Mace, G.M., Wayne, R.K., 2000. Considering evolutionary processes in conservation biology. Trends Ecol. Evol. 15, 290-295.
- Crisp, M., Cook, L., Steane, D., 2004. Radiation of the Australian flora: what can comparisons of molecular phylogenies across multiple taxa tell us about the evolution of diversity in present-day communities? Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences 359, 1551.
- Cunningham, C., Blackstone, N., Buss, L., 1992. Evolution of king crabs from hermit crab ancestors.
- De Queiroz, K., 2007. Species concepts and species delimitation. Syst. Biol. 56, 879-886.
- Doadrio, I., Dominguez-Dominguez, O., 2004. Phylogenetic relationships within the fish family Goodeidae based on cytochrome b sequence data. Mol. Phylogen. Evol. 31, 416-430.
- Doadrio, I., Domínguez, O., 2004. Phylogenetic relationship within the fish family Goodeidae based on cytochrome b sequence data. Mol. Phylogen. Evol. 31, 416-430.
- Domínguez-Domínguez, O., Doadrio, I., Pérez-Ponce de León, G., 2006. Historical biogeography of some river basins in Central Mexico evidenced by their goodeine freshwater fishes: A preliminary hypothesis using secondary Brooks Parsimony Analysis (BPA). J. Biogeogr., 1437-1447.
- Dominguez-Dominguez, O., Martinez-Meyer, E., Zambrano, L., De Leon, G.P.-P., 2006. Using Ecological-Niche Modeling as a Conservation Tool for Freshwater Species: Live-Bearing Fishes in Central Mexico. Conserv. Biol. 20, 1730-1739.
- Drummond, A.J., Ho, S.Y.W., Phillips, M.J., Rambaut, A., 2006. Relaxed phylogenetics and dating with confidence. PLoS Biol. 4, 699-710.
- Echelle, A., Carson, E., Echelle, A., Van Den Bussche, R., Dowling, T., Meyer, A., 2005a. Historical biogeography of the New-World pupfish genus *Cyprinodon* (Teleostei: Cyprinodontidae). Copeia 2005, 320-339.

- Echelle, A., Carson, E., Echelle, A., Van Den Bussche, R., Dowling, T., Meyer, A., 2005b. Historical biogeography of the new-world pupfish genus *Cyprinodon* (Teleostei: Cyprinodontidae). *Journal Information* 2005.
- Echelle, A., Echelle, A., 1998. Evolutionary relationships of pupfishes in the *Cyprinodon eximius* complex (Atherinomorpha: Cyprinodontiformes). *Copeia* 1998, 852-865.
- Edgar, R.C., 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucl. Acids Res.* 32, 1792-1797.
- Edwards, R., 2001. Ecological profiles for selected stream-dwelling Texas freshwater fishes III. TWDB Rep.(TWDB Contract Number: 95-483-107). Texas Water Develop. Board, Austin, TX.
- Feldmann, R., Grande, L., Birkhimer, C., Hannibal, J., McCoy, D., 1981. Decapod fauna of the Green River formation (Eocene) of Wyoming. *J. Paleontol.* 55, 788-799.
- Ferrari, L., 2000. Avances en el conocimiento de la Faja Volcánica Transmexicana durante la última década. *Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana* 53, 84-92.
- Ferrari, L., Conticelli, S., Potrone, C.M., Manetti, P., 2000a. Late Miocene volcanism and intra-arc tectonics during the early development of the Trans-Mexican Volcanic Belt. *Tectonophysics* 318, 161-185.
- Ferrari, L., Conticelli, S., Vaggelli, G., Petrone, C.M., Manetti, P., 2000b. Late Miocene volcanism and intra-arc tectonics during the early development of the Trans-Mexican Volcanic Belt. *Tectonophysics* 318, 161-185.
- Ferrari, L., Lopez-Martinez, M., Aguirre-Diaz, G., Carrasco-Nunez, G., 1999. Space-time patterns of Cenozoic arc volcanism in central Mexico: From the Sierra Madre Occidental to the Mexican Volcanic Belt. *Geology* 27, 303-306.
- Ferrari, L., Rosas-Elguera, J., 1999. Alkalic (ocean-island basalt type) and calc-alkalic volcanism in the Mexican volcanic belt: A case for plume-related magmatism and propagating rifting at an active margin?: Comment. *Geology* 27, 1055-1056.
- Fitzpatrick Jr, J.F., 1983. A Revision of the Dwarf Crawfishes (Cambaridae, Cambarellinae). *Journal of Crustacean Biology*, 266-277.
- Garrett, G., Hubbs, C., Edwards, R., 2005. Threatened fishes of the world: *Cyprinodon eximius* Girard 1859. *Environ. Biol. Fishes* 72, 98-98.
- Gesundheit, P., García, C., 2005. Biogeografía cladística de la familia Goodeidae (Cyprinodontiformes). *Regionalización biogeográfica en Iberoamérica y tópicos*

- afines: Primeras Jornadas Biogeográficas de la Red Iberoamericana de Biogeografía y Entomología Sistemática (RIBES XII. I-CYTED), J. Llorente Bousquets y JJ Morrone (eds.). Las Prensas de Ciencias, UNAM, México, DF, 319-338.
- Guindon, S., Gascuel, O., 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst. Biol.* 52, 696.
- Haq, B.U., Hardenbol, J., Vail, P.R., 1987. Chronology of Fluctuating Sea Levels since the Triassic. *Science* 235, 1156-1167.
- Harvey, P., May, R., Nee, S., 1994. Phylogenies without fossils. *Evolution* 48, 523-529.
- Henry, C., Aranda-Gomez, J., 2000. Plate interactions control middle-late Miocene, proto-Gulf and Basin and Range extension in the southern Basin and Range. *Tectonophysics* 318, 1-26.
- Hobbs, H.H.J., 1950. A new crayfish of the genus *Cambarellus* from Texas (Decapoda, Astacidae). *Proc. Biol. Soc. Wash.* 63, 89-96.
- Hobbs, H.H.J., 1974a. A checklist of the North and Middle American crayfishes (Decapoda: Astacidae and Cambaridae). *Smithson. Contrib. Zool.* 166, iii+161, 161-294.
- Hobbs, H.H.J., 1974b. Synopsis of the families and genera of crayfishes (Crustacea:Decapoda). *Smithson. Contrib. Zool.* 164, 1-32.
- Huelsenbeck, J.P., Ronquist, F., 2005. Bayesian analysis of molecular evolution using MrBayes. *Statistical methods in molecular evolution*. New York: Springer, 183-232.
- Israde-Alcántara, I., Garduño-Monroy, V.H., 1999. Lacustrine record in a volcanic intra-arc setting: the evolution of late Neogene Cuitzeo basin system (central-western Mexico, Michoacan). *Palaeogeography, Palaeoclimatology and Palaeoecology* 151, 209-227.
- Jobb, G., 2008. TREEFINDER. Version of October 2008., Munich, Germany.
- Knowlton, N., Weigt, L.A., 1998. New dates and new rates for divergence across the Isthmus of Panama. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 265, 2257-2263.
- Knowlton, N., Weigt, L.A., Solorzano, L.A., Mills, D.K., Bermingham, E., 1993. Divergence in proteins, mitochondrial DNA, and reproductive compatibility across the Isthmus of Panama. *Science* 260, 1629.

- Laguarda, A., 1961. Contribución al estudio comparativo de la fórmula branquial en la Familia Astacidae (Crustacea:Decapoda). Facultad de Ciencias, Departamento de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México, pp. 1-74.
- Lee, W., 1907. Water resources of the Rio Grande Valley in New Mexico and their development. US Geol. Surv. Water-Supply Irrigation Paper 188, 1-59.
- Losos, J.B., Glor, R.E., 2003. Phylogenetic comparative methods and the geography of speciation. *Trends Ecol. Evol.* 18, 220-227.
- Maddison, W.P., Maddison, D.R., 2009. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 2.73.
- Mateos, M., Sanjur, O.I., Vrijenhoek, R.C., 2002. Historical Biogeography of the Livebearing Fish genus *Poeciliopsis* (Poeciliidae: Cyprinodontiformes). *Evolution* 56, 972-984.
- McKinney, M., McNamara, K., Carter, B., Donovan, S., 1992. Evolution of Paleogene echinoids: a global and regional view. *Eocene-Oligocene climatic and biotic evolution*, 349-367.
- Miller, R., Smith, M., 1986a. Origin and geography of the fishes of central Mexico. *The Zoogeography of North American Freshwater Fishes*. Wiley, New York, 487-517.
- Miller, R.R., Smith, M.L., 1986b. Origin and geography of the fishes of Central Mexico. In: Hocutt, C.H., Wiley, E.O. (Eds.), *The Zoogeography of North American freshwater fishes*. Wiley-Intersciences publication, New York, USA.
- Near, T., Bolnick, D., Wainwright, P., 2005. Fossil calibrations and molecular divergence time estimates in centrarchid fishes (Teleostei: Centrarchidae). *Evolution* 59, 1768-1782.
- Nee, S., 2006. Birth-Death Models In Macroevolution. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 37, 1-17.
- Ornelas-García, C., Domínguez-Domínguez, O., Doadrio, I., 2008. Evolutionary history of the fish genus *Astyanax* Baird & Girard(1854)(Actinopterygii, Characidae) in Mesoamerica reveals multiple morphological homoplasies. *BMC Evol. Biol.* 8, 340.
- Porter, M., Pérez-Losada, M., Crandall, K., 2005. Model-based multi-locus estimation of decapod phylogeny and divergence times. *Mol. Phylogen. Evol.* 37, 355-369.
- Posada, D., 2008. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Mol. Biol. Evol.* 25, 1253.
- Rabosky, D., 2006. LASER: a maximum likelihood toolkit for detecting temporal shifts in diversification rates from molecular phylogenies.

- Rabosky, D., 2007. Likelihood methods for detecting temporal shifts in diversification rates. *Evolution* 60, 1152-1164.
- Rabosky, D.L., Lovette, I.J., 2008. Explosive Evolutionary Radiations: Decreasing Speciation or Increasing Extinction Through Time? *Evolution* 62, 1866-1875.
- Rambaut, A., 2002. Phyl-O-Gen: phylogenetic tree simulator package, v1. 1. See <http://evolve.zoo.ox.ac.uk/software.html>.
- Rambaut, A., Charleston, M., 2002. TreeEdit: phylogenetic tree editor, ver. 1.0 alpha 10. Department of Zoology, University of Oxford, Oxford.
- Rambaut, A., Drummond, A.J., 2007. Tracer v1.4, Available from: <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>.
- Reeves Jr, C., 1965. Pluvial Lake Palomas, northwestern Chihuahua, Mexico, and Pleistocene geologic history of south central New Mexico. Guidebook 16. New Mexico Geological Society, pp. 199–203.
- Riggs, S., 1984. Paleooceanographic model of Neogene phosphorite deposition, US Atlantic continental margin. *Science* 223, 123.
- Rodríguez-Almaraz, G., Campos, E., 1994. Distribution and status of the crayfishes (Cambaridae) of Nuevo León, México. *Journal of Crustacean Biology* 14, 729-735.
- Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P., 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19, 1572.
- Schönhuth, S., Doadrio, I., Dominguez-Dominguez, O., Hillis, D., Mayden, R., 2008. Molecular evolution of southern North American Cyprinidae (Actinopterygii), with the description of the new genus *Tampichthys* from central Mexico. *Mol. Phylogen. Evol.* 47, 729-756.
- Shimodaira, H., Hasegawa, M., 1999. Multiple comparisons of log-likelihoods with applications to phylogenetic inference. *Mol. Biol. Evol.* 16, 1114-1116.
- Sites Jr, J., Marshall, J., 2004. Operational criteria for delimiting species.
- Slowinski, J.B., 2001. Molecular Polytomies. *Mol. Phylogen. Evol.* 19, 114-120.
- Smith, M., Miller, R., 1986. The evolution of the Rio Grande Basin as inferred from its fish fauna, p. 457–485. In: Hocutt, C., Wiley, E. (Eds.), *The Zoogeography of North American Freshwater Fishes*. John Wiley and Sons, New York.
- Song, H., Buhay, J.E., Whiting, M.F., Crandall, K.A., 2008. Many species in one: DNA barcoding overestimates the number of species when nuclear mitochondrial pseudogenes are coamplified. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 13486-13491.

- Stillman, J., Reeb, C., 2001. Molecular phylogeny of eastern Pacific porcelain crabs, genera *Petrolisthes* and *Pachycheles*, based on the mtDNA 16S rDNA sequence: phylogeographic and systematic implications. *Mol. Phylogen. Evol.* 19, 236-245.
- Swift, C., Gilbert, C., Bortone, S., Burgess, G., Yerger, R., 1986. Zoogeography of the freshwater fishes of the southeastern United States: Savannah River to Lake Pontchartrain. In: Hocutt, C.H., Wiley, E.O. (Eds.), *Zoogeography of North American freshwater fishes*. John Wiley and Sons, New York, pp. 213–255.
- Swofford, D.L., 1998. *PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and Other Methods)*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Thomas, E., 1992. Middle Eocene–late Oligocene bathyal benthic foraminifera (Weddell Sea): Faunal changes and implications for ocean circulation. Eocene–Oligocene climatic and biotic evolution. Princeton Univ. Press, Princeton, NJ, 245–271.
- Toon, A., Finley, M., Staples, J., Crandall, K.A., 2009. Decapod Phylogenetics and Molecular Evolution. In: Martin, J.W., Crandall, K.A., Felder, D.L. (Eds.), *Decapod Crustacean Phylogenetics*. Taylor and Francis Group, LLC, Boca Raton, FL.
- Turgeon, J., Stoks, R., Thum, R., Brown, J., McPeck, M., 2005. Simultaneous Quaternary radiations of three damselfly clades across the Holarctic. *Am Nat* 165, E78-E107.
- Van Straelen, V., 1928. On a fossil freshwater crayfish from eastern Mongolia. *Bulletin of the Geological Society of China* 7, 133-138.
- Villalobos, A., 1955. *Cambarinos de la fauna Mexicana (Crustacea:Decapoda)*. Facultad de Ciencias, Departamento de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México, p. 290.
- Walsh, H., Kidd, M., Moum, T., Friesen, V., 1999. Polytomies and the power of phylogenetic inference. *Evolution*, 932-937.
- Webb, S.A., Graves, J.A., Macias-Garcia, C., Magurran, A.E., Foighil, D.Ó., Ritchie, M.G., 2004. Molecular phylogeny of the livebearing Goodeidae (Cyprinodontiformes). *Mol. Phylogen. Evol.* 30, 527–544.
- Whiting, M.F., 2002. Mecoptera is paraphyletic: multiple genes and phylogeny of Mecoptera and Siphonaptera. *Zool. Scr.* 31, 93-104.
- Whiting, M.F., Carpenter, J.C., Wheeler, Q.D., Wheeler, W.C., 1997. The Strepsiptera Problem: Phylogeny of the Holometabolous Insect Orders Inferred from 18S and 28S Ribosomal DNA Sequences and Morphology. *Syst Biol* 46, 1-68.

Yule, G.U., 1925. A Mathematical Theory of Evolution, Based on the Conclusions of Dr. J. C. Willis, F.R.S. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character 213, 21-87.

Capítulo 5

Marcadores microsatélites para el cangrejo de río enano, *Cambarellus chapalanus* Faxon, 1898 (Decapoda, Cambaridae) del Centro de México.

5.1 RESUMEN

Nueve loci microsatélites polimórficos fueron aislados y caracterizados para el cangrejo de río enano de Chapala (*Cambarellus chapalanus* Faxon, 1898). Los nuevos loci mostraron un grado variable de polimorfismo, que fue de 3 a 31 alelos por locus y niveles moderados de heterocigosidad ($H_O = 0,42 \pm 0,28$). La mayoría de los loci fueron amplificados con éxito en otros cangrejos de río y podrían ser útiles sobre todo para especies del mismo género, aunque potencialmente lo pueden ser para otras especies de cangrejos de río de la familia Cambaridae. Estos loci pueden ser útiles en la evaluación de la estructura de las poblaciones del cangrejo de río enano de Chapala y de las posibles relaciones de migración y flujo genético entre especies cercanas.

5.2 AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN

El cangrejo de río enano de Chapala, *Cambarellus chapalanus* Faxon, 1898 es una especie endémica del centro de México, que habita los cuerpos de agua de la cuenca Lerma-Santiago (Villalobos, 1955). En un estudio previo de la filogenia molecular del género (capítulo III, esta tesis) se observó una estrecha relación de esta especie y una serie de otros linajes de las cuencas cercanas, lo que podría reflejar posibles eventos recientes de separación entre los linajes y procesos de radiación. Aún más, se ha encontrado que diferentes especies en el lago de Chapala del centro de México comparten haplotipos mitocondriales. Para evaluar la hipótesis de la existencia de patrones de divergencia incipiente y el flujo genético entre poblaciones, así como para estudiar posibles eventos de hibridación, es necesario proveer de evidencia proveniente de marcadores moleculares que proporcionen una definición a una escala temporal

adecuada. Aquí se reporta el aislamiento y caracterización de nueve loci microsatélites polimórficos de *Cs. chapalanus* y los resultados de las pruebas de amplificación cruzada en otras especies de cangrejos de río.

Los loci microsatélites fueron aislados usando un protocolo modificado de enriquecimiento (Gardner *et al.*, 1999), de acuerdo a lo detallado en (Bloor *et al.*, 2006). El ADN de *Cs. chapalanus* fue extraído de tejido muscular del quelípedo de un individuo (proveniente del río Camécuaro, México) usando un protocolo estándar de fenol:diclorometano:alcohol isoamílico (Sambrook *et al.*, 1989). Con el fin de obtener el perfil de digestión deseado (fragmentos de entre 400 y 1.500 pb), una limpieza de ADN se llevó a cabo usando electroforesis en gel y posterior extracción de ADN en gel. La digestión se realizó con la endonucleasa MboI (10U / 1µg de ADN), estandarizado para una digestión exitosa). Esta biblioteca genómica parcial construida a partir de fragmentos de tamaños seleccionados se ligó a un adaptador (Refseth *et al.*, 1997) y se enriqueció para una secuencia en repetición. La hibridación se llevó a cabo utilizando oligos marcados con biotina en el extremo 3' consistentes en las siguientes repeticiones: ACAG, AGAT, AAAG, AAG, GAT, CT y CA y el producto fue unido a cuentas recubiertas de estreptavidina (Dynabeads M-280, Invitrogen). Las condiciones de captura, la recuperación de ADN enriquecido por la reacción en cadena de polimerasa (PCR), la clonación y la identificación de clones que contenían microsatélites por PCR de colonias se llevaron a cabo siguiendo las recomendaciones de Bloor *et al.* (2006). Los clones positivos fueron secuenciados en un secuenciador de ADN ABI 3730 (Applied Biosystems).

Trescientos ochenta y un clones positivos fueron identificados y secuenciados de un total de 1.056 colonias analizadas. 97 de ellos (9,18% del total proyectado) contenían secuencia de repetición. De éstos, 27 fueron excluidos por contener repeticiones minisatélite y 20 eran demasiado grandes para ser posteriormente genotipados (> 400 pb) o no había suficiente secuencia para diseñar cebadores. 62 pares de iniciadores fueron diseñados para las 50 secuencias restantes que contenían microsatélites con el programa Primer3 (Rozen y Skaletsky, 2000).

Todos los cebadores se probaron para la amplificación en ocho individuos adultos. Los cebadores que resultaron en una amplificación positiva y de un producto del tamaño esperado fueron probados para el polimorfismo mediante el marcaje del cebador “forward”, con los marcajes fluorescentes 6 - FAM, NED o HEX (Applied Biosystems) y usando individuos colectados en Camécuaro (n = 25) y el Lago de Chapala (n = 28), ambos en el centro de México. 37 pares de cebadores fueron descartados debido a la ausencia de amplificación en todos los individuos y cuatro porque eran difíciles de genotipar, debido a la amplificación artificial de varios picos. Posteriormente, se extrajo el ADN siguiendo las mismas condiciones descritas anteriormente. Las amplificaciones se llevaron a cabo en un volumen de reacción de 10 µL. Las condiciones de PCR fueron: una desnaturalización inicial a 95 ° C durante 5 min, seguida de 35 ciclos de 95 ° C durante 30 s, T anillamiento durante 45 s (ver Tabla 1) y 72 ° C durante 45 s, y finalmente, 72 ° C durante 5 min como paso de extensión final. Cada reacción contenía 75 mM de Tris-HCl (pH 8.8), 20 mM (NH₄)₂SO₄, 0,01% (v / v) de Tween 20, 0,2 mM de cada dNTP, 2,0 mM de MgCl₂, 5-50 ng de ADN molde, 10 pmol de cada cebador y 0,1 U de Taq polimerasa (Biotools). Los productos de PCR se combinaron con un estándar de tamaño (ROX, Applied Biosystems), y se analizaron

en un secuenciador automático ADN ABI 3730 (Applied Biosystems). Los genotipos obtenidos se obtuvieron utilizando el programa GeneMapper 3.7 (Applied Biosystems). Para probar su utilidad como marcadores en otros taxones, la amplificación cruzada en otras especies ha sido probada utilizando un individuo de diferentes especies de cangrejos de río incluidas en dos familias diferentes (Cambaridae y Astacidae).

El programa GENEPOP (Raymond y Rousset, 1995) se utilizó para calcular las medidas básicas de la diversidad genética (en todas las muestras). Se probaron la posible desviación de las condiciones previstas bajo el equilibrio Hardy-Weinberg teniendo en cuenta la deficiencia de heterocigotos como hipótesis alternativa (dentro de cada localidad) y el desequilibrio de ligamiento entre todos pares de loci. Los valores de significación se corrigieron aplicando el procedimiento secuencial de Bonferroni para pruebas múltiples (Rice, 1989). De los loci probados, ninguno resultó monomórfico. Las características de polimorfismo resultado de los nueve loci se resumen en la Tabla 1. El número de alelos osciló entre 3 (loci Csch5 y Csch6) y 24 (locus Csch2) (Tabla 1), las heterocigosidades observada y esperada variaron entre 0,14 y 0,7, y 0,13 y 0,93, respectivamente (Tabla 1). No se encontró evidencia de desequilibrio de ligamiento entre todos los pares de loci ($P > 0,05$). Un locus mostró desviación de las condiciones previstas de Hardy-Weinberg (Csch3) en ambas localidades, y otro para la población del lago de Chapala (Csch4). Una posible explicación a la deficiencia de heterocigotos observada podría ser una estructura genética desapercibida dentro de las localidades. El hecho de que se han podido genotipar la mayoría de los especímenes sugiere que la deficiencia de heterocigotos observados no fue originado por un fenómeno de “allelic drop-out”. Un análisis basado en más individuos y de varias localidades más se requeriría para poner a prueba la estructura genética dentro de las poblaciones. La

amplificación cruzada dio lugar a amplificaciones positivas para varias especies de cangrejos de río, especialmente para aquellas del género *Cambarellus* (Tabla 2). El éxito de la amplificación de estos loci da la posibilidad de utilizarlos para estudios de poblaciones de estas especies. Todos los loci amplificaron positivamente en *Cs. montezumae*, mientras que cuatro y dos loci amplificaron con éxito en *Cs. shufeldtii* y ambos, *Cs. puer* y *Cs. texanus*, respectivamente. Dos loci adicionales presentaron patrones de amplificación artificial de varias bandas en diferentes especies. Un locus (Csch1) fue amplificado en las especies de las dos familias incluidas. Además, los loci Csch7 y Csch2 fueron amplificados con éxito en *Orconectes virilis* y *Austropotamobius italicus*, respectivamente.

Tabla 1. Resumen de los datos de los loci microsatélites aislados en el cangrejo enano de Chapala, *Cambarellus chapalanus*.

Locus	Secuencia (5'-3')	Motivo (en el alelo clonado)	Tamaño de Alelos				
			Ta	Na	Ho	He	
			(C°)				
Csch1	F: GAGCCAGTGTACACAGTCCA* R: GTTTCCTCTATGCCCGTGGAGGAG	(TGTC) ₁₀	141-217	62	15	0.67	0.74
Csch2	F: AAGTATCCATTCCCACTT† R: GTTCTTCGGCTGATAGATAAATG	(CAGT) ₁₀ ...(CAGT) ₈ (CAGC) ₄	163-315	62	24	0.62	0.93
Csch3	F: TCTGTAGACTGACATCTGTGAA‡ R: TCTCCTGGCAGGCATAGTC	(GGCT) ₆ ...(GGCT) ₁₁ ...(GGCT) ₄ (AGCT) ₂	229-261	62	9	0.44	0.79
Csch4	F: CACAGATGCTAGTCGCTTG‡ R: GTTCTTCGGGCTTGAGGAATAAAGA	(TGGC) ₄ ...(TGGC) ₁₃	176-256	65	23	0.53	0.92
Csch5	F: GTAATTGTTGGGCTTCC‡ R: TTCAGCTGATGCACCTATTCA	(CT) ₃ (CTGT) ₃ ...(CTGT) ₈ ...(CTGT) ₁₂	138-142	50	3	0.63	0.51
Csch6	F: CCTATGTTCCGTCGCCGTTCC* R: GACTTTGTCTTCACTCTCCT	(ACAG) ₆ (AGAC) ₂ (ACAG) ₄ (AGAC) ₂	116-160	50	3	0.14	0.13
Csch7	F: CGGTATAACAGACTGACCAGGTG‡ R: TTTACCAAGAGCTGTGAACG	(TC) ₂ TG(TC) ₂ (TGTC) ₃ (TG) ₃ (TCTG) ₉	167-259	60	24	0.70	0.91
Csch8	F: TGCAGACACAAATCGGTGAG* R: TCAACCCCATTTCCACACAG	(CAGA) ₂ (CA) ₆ (CAGA) ₂ (CA) ₂ CAGA(CA) ₁₀	156-224	60	15	0.51	0.52
Csch9	F: CTGCAGACACAAATCGGTGA† R: TCATGTCACTCCCATTTCCCT	(AC) ₁₁ (AGAC) ₂ (AC) ₅ (AC) ₃ AG(AC) ₁₀	112-192	68	18	0.49	0.89

Marcajes: *6-FAM, †HEX y ‡NED; NA, número de alelos por locus; heterocigosidad esperada (H_E) y observada (H_O). Ta = temperatura de anillamiento.

Tabla 2. Amplificación cruzada de los loci aislados en diferentes especies de cangrejos de río, pertenecientes a las familias Cambaridae y Astacidae.

Locus	Cs. <i>montezumae</i>	Cs. <i>shufeldtii</i>	Cs. <i>puer</i>	Cs. <i>texanus</i>	P. <i>clarkii</i>	O. <i>virilis</i>	Pa. <i>leniusculus</i>	A. <i>italicus</i>
Csch1	+	+	+	+	-	+	+	+
Csch2	+	+	-	-	-	-	-	+
Csch3	+	-	-	-	-	-	-	-
Csch4	+	-	-	-	-	-	-	-
Csch5	+	‡	‡	‡	-	-	-	‡
Csch6	+	-	-	-	-	-	-	-
Csch7	+	+	+	+	-	+	-	-
Csch8	+	+	-	-	-	-	-	-
Csch9	+	‡	‡	‡	-	-	-	-

+ amplificación exitosa, - no se obtuvo amplificación, ± amplificación no específica de varias bandas.

Los géneros están abreviados como sigue: Cs., *Cambarellus*; P, *Procambarus*; O, *Orconectes*; Pa, *Pacifastacus*; A, *Austropotamobius*.

Capítulo 6

**Evaluación del flujo genético entre
dos cangrejos de río con
morfologías divergentes en el Lago
Chapala, Centro de México.**

... 6.1 INTRODUCCIÓN

6.1.1 Especiación y cladogénesis

La especiación es el proceso por el cual tiene lugar la generación de diversidad biológica, por lo que entender los patrones y procesos bajo los cuales se da es fundamental para explicar la diversidad de la vida (Mayr, 1963). Parte importante del conocimiento de los patrones de especiación en un grupo es la información proveniente de los atributos geográficos y ecológicos de las especies que lo conforman, los cuales a su vez se relacionan con dos modelos de especiación distintos (Barracough, 1998; Berlocher, 1998; Brooks y McLennan, 1991). Los atributos geográficos resultan de la combinación entre la historia cladogenética y los eventos biogeográficos que han afectado dicha cladogénesis. Estos patrones se relacionan con el modelo de especiación por mutación, definido como la evolución de aislamiento reproductivo en poblaciones separadas que experimentan presiones de selección similares (Turelli *et al.*, 2001). Por su parte los atributos ecológicos tienen que ver con el origen de la diversidad por medio de selección natural entre ambientes contrastantes, y se relacionan con el modelo de especiación ecológica, definido como la evolución de aislamiento reproductivo entre poblaciones por selección natural divergente como resultado de habitar condiciones ecológicas contrastantes (Rundle y Nosil, 2005; Schluter, 2000, 2001). Este modelo predice que el aislamiento (o interrupción del flujo genético) evolucionaría entre poblaciones que se han adaptado a ambientes contrastantes, pero no entre poblaciones

habitando en ambientes similares. Dichos ambientes se denominan hábitats selectivos (Schluter, 2000).

Los atributos geográficos de la subfamilia Cambarellinae fueron abordados en un estudio previo, que ha mostrado que el patrón cladogenético más común es la especiación en alopatría, como resultado de eventos vicariantes climáticos y geológicos, como la formación del Cinturón Volcánico Transversal (CVT) en el Centro de México (ver capítulo 4 de esta tesis). Una excepción fue detectada, en el caso de dos especies hermanas, *Cambarellus prolixus* y *Cs. chapalanus*, encontradas en simpatría en el Lago Chapala, en el centro de México. Este hecho no es coherente, en principio, con lo esperado en un escenario de especiación por alopatría (Barraclough y Vogler, 2000), aunque varios factores pueden explicar la simpatría de especies hermanas, como son la dispersión y los movimientos geológico-climáticos, que facilitan el contacto posterior a la cladogénesis.

Alternativamente sin embargo, el patrón de especies hermanas habitando un mismo lago, puede deberse a atributos ecológicos del grupo, siendo la base de un proceso de divergencia adaptativa. Este proceso suele ir unido a evidencias de divergencia de otro tipo entre las poblaciones, como son la aparición de morfologías muy diferentes en distintos tipos de hábitats (Pfennig *et al.*, 2010). Aportar una evidencia útil que permita la distinción entre ambos modelos de especiación, entendidos como hipótesis, y ver cómo contribuyen al patrón de diversificación observado, constituye el objetivo de este capítulo.

6.1.2 El estudio de la divergencia entre *Cambarellus chapalanus* y *Cambarellus prolixus*.

El Lago de Chapala , se localiza en el centro de México a una latitud de entre 20°07' y 20°20' norte y a una longitud entre 102°40' y 103°25' oeste. Situado en los estados de Jalisco y Michoacán, forma parte del sistema hidrológico Lerma-Santiago, tiene 77 km de longitud en dirección este-oeste y una anchura media de 15 km y una profundidad media de 7.1 m. Es el lago más extenso de México y el tercero en superficie de latino América, con una elevación superficial de agua 1524 msnm (metros sobre el nivel del mar). Se ha estimado que a este nivel, el lago tiene una superficie de 111.200 ha, y una capacidad cercana a los 8 Mm³. El fondo en general tiene una pendiente poco pronunciada, que se acentúa desde el delta del río Lerma, su mayor afluente, localizado en el extremo este, hasta el máximo alcanzado hacia el centro-norte del lago para luego reducirse nuevamente en sentido oeste.

En este lago se encuentran codistribuidas dos especies de cangrejos *Cambarellus prolixus* y *Cambarellus chapalanus* cuyo análisis filogenético previo ha demostrado que son especies hermanas (Ver capítulo 3 de esta tesis doctoral). La especie *Cs. prolixus* tiene una de las morfologías más diferenciadas dentro del género *Cambarellus* que incluye un plan corporal único con apéndices especialmente alargados y ausencia de pigmentación (ver figura 2). Esta especie (*Cs. prolixus*) es endémica del Lago Chapala, y es la única especie de cangrejo de río cuya presencia se ha relacionado con un hábitat como son las zonas profundas del lago Chapala, específicamente a partir de los cuatro metros de profundidad. (Villalobos-Figueroa y Hobbs, 1981). La especie hermana de *Cs. prolixus* es *Cs. chapalanus* una especie distribuida en la cuenca de Chapala, que

incluye el Lago Chapala y la parte baja de sus dos afluentes, el río Lerma y el río Duero (De Anda *et al.*, 1998). La morfología de esta especie incluye un plan corporal generalista, similar al del resto de especies del grupo (ver Figura 2). Dada la escasa divergencia genética entre ambas especies (ver capítulo 4 de esta tesis) y por ser metodológicamente más adecuado para la descripción de hipótesis de divergencia adaptativa entre ellas, en este trabajo se hará referencia a las dos en términos de morfotipos, es decir, morfotipo prolixus y morfotipo chapalanus.

Con el fin de probar una hipótesis de divergencia adaptativa en este sistema, una asunción es requerida. Dado que existen poblaciones compuestas exclusivamente por el morfotipo prolixus en el Lago Chapala, y que es la única especie del grupo que habita en condiciones de profundidad, es razonable asumir que dichas condiciones representen un hábitat selectivo. Éste se define como el espacio que presenta condiciones específicas que son explotadas diferencialmente por un grupo de individuos de una población o especie (Pfennig *et al.*, 2010; Schluter, 2000), la cual además suele presentar caracteres producto de la adaptación a tales condiciones y por lo tanto, sujetos a selección natural. La utilización diferencial de los recursos disponibles en el ambiente define una presión de selección sobre estos caracteres que puede ser de diferentes tipos y es esta selección la que explica en última instancia la divergencia adaptativa (Nijhout, 2003). La naturaleza plástica o adaptativa de dichos caracteres en el morfotipo prolixus no se ha comprobado hasta ahora, pero esto no es necesario para los objetivos de este trabajo, ya que éstos se enfocan a probar las señales genéticas esperables en un escenario de divergencia adaptativa, que es sólo una de seis condiciones observables bajo especiación ecológica (Hendry y Taylor, 2004; Rundle y Nosil, 2005).

En este sentido, existe una larga controversia tanto en términos teóricos como empíricos alrededor de la factibilidad de la evolución a partir de mecanismos adaptativos así como de la importancia que estos procesos puedan tener para la historia evolutiva de un grupo (Bernatchez *et al.*, 1999; Gould y Lewontin, 1979; Hendry y Taylor, 2004; Losos, 2000; Losos y Mahler, 2010; Mayr, 1963; Pfennig *et al.*, 2010; Schluter y McPhail, 1993). En diferentes ocasiones, sin embargo, se ha aceptado que la especiación vía selección natural puede ocurrir a consecuencia de divergencia adaptativa (Jiggins *et al.*, 2001; Mayr, 1963), si bien hasta el momento esta hipótesis no ha sido evaluada en cangrejos de río.

6.1.3 Escenarios propuestos

En este trabajo se busca identificar los patrones evolutivos involucrados en el patrón cladogenético observado entre las especies *Cs. chapalanus* y *Cs. prolixus*, dado que se trata de dos especies hermanas en simpatría. La aplicación del método científico permite plantear hipótesis y valorar su validez en un contexto determinado (Platt, 1964). Con esta base se plantearon las siguientes hipótesis, considerando como hipótesis nula aquella del patrón más observado en el grupo, la especiación por mecanismos alopátricos (vía deriva y mutación en alopatría) (Futuyma y Mayer, 1980):

1) Dado que la simpatría entre especies hermanas puede ser el resultado de un contacto secundario en función de los rasgos de la historia de vida de las especies (como tasas de dispersión) (Foitzik *et al.*, 2009) y/o por modificaciones geográficas, se esperaría observar una estructura haplotípica que diferenciara ambas especies y una escala temporal coherente con los movimientos geológicos y/o climáticos que han

causado la divergencia en otras especies de agua dulce en la región. Para probar esta hipótesis se infirieron diferentes parámetros de poblaciones del grupo a partir de la información generada por los genes mitocondriales, describiendo su historia filogeográfica. El marco metodológico propuesto para probar esta primera hipótesis se encuentra explicado en el apartado de filogeografía y demografía.

2) De existir divergencia generada por adaptación a diferentes condiciones ecológicas entre los morfotipos *prolixus* y *chapalanus*, se esperaría que el flujo genético entre las poblaciones que habitan diferentes ambientes adaptativos fuera menor al de poblaciones del mismo ambiente adaptativo. Los individuos colectados fueron asignados a dos morfologías de acuerdo a los caracteres diagnósticos de cada especie y la asignación y diferenciación de estas dos categorías morfológicas a grupos genéticos fue evaluada con marcadores nucleares microsatélites utilizando diferentes métodos estadísticos, como se describe en el apartado de genética de poblaciones. Complementariamente, la existencia de más de un ambiente selectivo al correspondiente a las condiciones presentes en el hábitat de *prolixus* fue evaluada por medio del grado de aislamiento genético de las poblaciones mediante estimas de flujo génico y migración.

... 6.2 MÉTODOS

6.2.1 Filogeografía y demografía.

6.2.1.1 Muestreo y obtención de datos

Para contar con un marco evolutivo adecuado para el estudio de la variabilidad genética de las poblaciones, se llevó a cabo un estudio de la historia poblacional por medio de la estimación de las relaciones haplotípicas y por tanto la historia filogeográfica entre las poblaciones de *Cambarellus chapalanus* y el resto de especies distribuidas en el centro de México.

Se llevó a cabo un muestreo extensivo de las poblaciones en el intervalo de distribución del género *Cambarellus* en el centro de México, desde el extremo oriental, en los lagos cráter del estado de Puebla, hasta el río Grande Santiago en el occidente del Cinturón Volcánico Transversal (CVT, Tabla 1, Figura 1).

Tabla 1. Localidades de *Cambarellus* incluidas en los análisis de ADN mitocondrial y nuclear. Se muestran los códigos de aquellas incluidas en el estudio con loci microsatélites.

	Especie	Localidad	Cuenca/grupo de haplotipo	N (mt)	Cod.	Coordenadas	
						x	y
1	<i>Cambarellus sp.</i>	Ciénega Santa María, Michoacán	Cuitzeo			19°47'25.4"	101°13'39.6"
2	<i>Cambarellus sp.</i>	Maravatío, Michoacán	Lerma Medio			19°48'39.27"	100°23'5.31"
3	<i>Cambarellus sp.</i>	Legunas Zempoala, Morelos	Interior			19° 0'18.12"	99° 1'46.48"
4	<i>Cambarellus sp.</i>	Dren La Cinta, Michoacán	Lerma Medio			20° 5'13.13"	101° 9'19.22"
5	<i>Cambarellus sp.</i>	Atécuaro, Michoacán	Cuitzeo			19°34'44.29"	101°10'32.26"

6. Evaluación del flujo genético entre morfotipos de *Cambarellus*

6	<i>Cambarellus sp.</i>	Chiquimitío, Michoacán	Cuitzeo		19°47'59.70"	101°14'59.89"
7	<i>Cambarellus sp.</i>	Lago cráter Aljojuca, Puebla México	Interior		19° 5'59.86"	97°30'15.17"
8	<i>Cambarellus sp.</i>	Presa Tepuxtepec, Edo. México	Lerma Medio		19°58'40.04"	100°13'5.04"
9	<i>Cambarellus sp.</i>	Las Rosas, San Juan del Río, Querétaro	Pánuco		20°30'31.03"	99°51'57.28"
10	<i>Cambarellus sp.</i>	Loma Alta, Michoacán	Cuitzeo		19°55'46.45"	100°51'1.51"
11	<i>Cambarellus patzcuarensis</i>	Janitzio, Lago de Patzcuaro, Michoacán	Pátzcuaro		19°35'45.69"	101°38'29.32"
12	<i>Cambarellus patzcuarensis</i>	Opoeco, Lago Zirahuén, Michoacán	Interior		19°24'22.42"	101°36'6.80"
13	<i>Cambarellus patzcuarensis</i>	Manantial Chapultepec, Michoacán	Pátzcuaro		19°34'25.92"	101°31'36.73"
14	<i>Cambarellus sp.</i>	Manantial, La Mintzita, Michoacán	Cuitzeo		19°39'6.25"	101°16'37.93"
15	<i>Cambarellus chapalanus</i>	Presa Cuerámara, Tres Villas, Guanajuato	Turbio river		19°48'16.07"	102°41'0.03"
16	<i>Cambarellus chapalanus</i>	Laguna San Juanico, Cotija Michoacán	Interior	COT	19°50'31.00"	102°39'41.85"
17	<i>Cambarellus chapalanus</i>	Pesa Huaracha, Jalisco	Chapala	HUA	19°57'16.63"	102°33'1.35"
18	<i>Cambarellus chapalanus</i>	Zapotlán Lago, Jalisco	Interior		19°45'50.78"	103°26'19.94"
19	<i>Cambarellus chapalanus</i>	San Julián, Jalisco	Verde/Santiago		21° 1'58.36"	102°20'43.91"
20	<i>Cambarellus chapalanus</i>	Presa San Miguel, Guanajuato	río La Laja		20°49'18.46"	100°48'9.37"
21	<i>Cambarellus chapalanus</i>	Presa San Isidro, Jalisco	Verde/Santiago		20°58'58.39"	102°10'10.97"
22	<i>Cambarellus chapalanus</i>	Ajijic, Lago Chapala, Jalisco	Chapala	AJI	20°16'12.37"	103°14'33.85"
23	<i>Cambarellus chapalanus</i>	Manantial Camécuaro, Michoacán	Chapala	CAM	19°54'36.98"	102°12'24.38"
24	<i>Cambarellus chapalanus</i>	Manantial La Luz, Michoacán	Chapala	LUZ	19°58'55.88"	101°30'30.32"
25	<i>Cambarellus chapalanus</i>	Jamay, Lago Chapala	Chapala	JAM	20°16'25.21"	102°43'28.95"
26	<i>Cambarellus chapalanus</i>	La Palma, Michoacán	Chapala	PAL	20° 9'16.25"	102°45'49.16"
27	<i>Cambarellus prolixus</i>	Isla Patos, Lago Chapala	Chapala	ISP	20°18'39.70"	103° 7'42.42"
28	<i>Cambarellus prolixus</i>	Ocotlán, Jalisco	Chapala	COL	20°17'41.36"	102°47'43.84"
29	<i>Cambarellus chapalanus</i>	Negritos, Michoacán	Chapala	NEG	20° 8'34.74"	102°48'38.18"
30	<i>Cambarellus sp.</i>	Arroyo San Juan, Jalisco	río Ameca		20°39'20.65"	103°54'32.62"
31	<i>Cambarellus sp.</i>	Arroyo Chapulimita, Jalisco	río Ameca		20°45'44.17"	103°58'44.94"
32	<i>Cambarellus sp.</i>	Los Veneros, Jalisco	río Ameca		20°40'37.02"	103°52'13.40"
33	<i>Cambarellus sp.</i>	Laguna Zacapu, Michoacán	río Angulo		19°48'36.11"	101°47'13.79"
34	<i>Cambarellus montezumae</i>	Lago cráter Quechulac, Puebla	Interior		19°24'8.91"	97°23'39.28"
35	<i>Cambarellus montezumae</i>	Xochimilco, Estado de México	Valle de México		19°15'52.92"	99° 5'56.92"
36	<i>Cambarellus sp.</i>	El Vegil, Amealco, Querétaro	Lerma Medio		20°25'48.36"	100°21'6.97"
37	<i>Cambarellus occidentalis</i>	Laguna Magdalena, Jalisco	Interior		20°54'25.82"	103°58'53.02"
38	<i>Cambarellus occidentalis</i>	Tepic, Nayarit	Santiago		21°28'51.62"	104°49'59.54"
39	<i>Cambarellus prolixus</i>	San Pedro Itzicán 1, Jalisco	Chapala	CA1	20.280123	102.921414
40	<i>Cambarellus prolixus</i>	San Pedro Itzicán 2, Jalisco	Chapala	CA2	20.244492	102.916491
41	<i>Cambarellus chapalanus</i>	Venustiano Carranza, Michoacán	Chapala	VEN	20.175388	102.773324
42	<i>Cambarellus chapalanus</i>	Briseñas, Jalisco	Chapala	BRI	20.218876	102.686690

N se refiere al número de muestras utilizadas en el análisis mitocondrial (incluyendo ambos genes). Cod. hace referencia a los códigos usados para las poblaciones usadas en los análisis de poblaciones, en negritas las usadas para los análisis de ADN nuclear.

Se tomaron muestras de tejido correspondientes al cuarto pereopodo que fue conservado en alcohol al 70% para su posterior procesamiento. Los individuos colectados fueron determinados con base a los caracteres diagnósticos disponibles en las descripciones originales, ya que las claves actuales son de escasa utilidad para la determinación del grupo, por ser anteriores a la descripción de *Cs. prolixus* y utilizar caracteres de gran plasticidad intrapoblacional como el grado de estilización de las espinas supraorbitales (Villalobos-Figueroa y Hobbs, 1981). El morfotipo *prolixus* fue diferenciado claramente de los otros morfotipos en base a los siguientes caracteres diagnósticos: longitud del acúmen, longitud del primer mesocarpo, (proporciones corporales respecto a la longitud total), ausencia de pigmentación y presencia de dos espinas especialmente alargadas en el primer basopodito. En general los caracteres son de mayor longitud con respecto al plan corporal (ver Figura 2) lo que le diferencia claramente del morfotipo *chapalanus*, que es más similar al resto de especies en el género en estos caracteres. Además, para la mayoría de las especies se colectaron ejemplares en cada una de las *Terra Typica* (Villalobos-Figueroa y Hobbs, 1981).

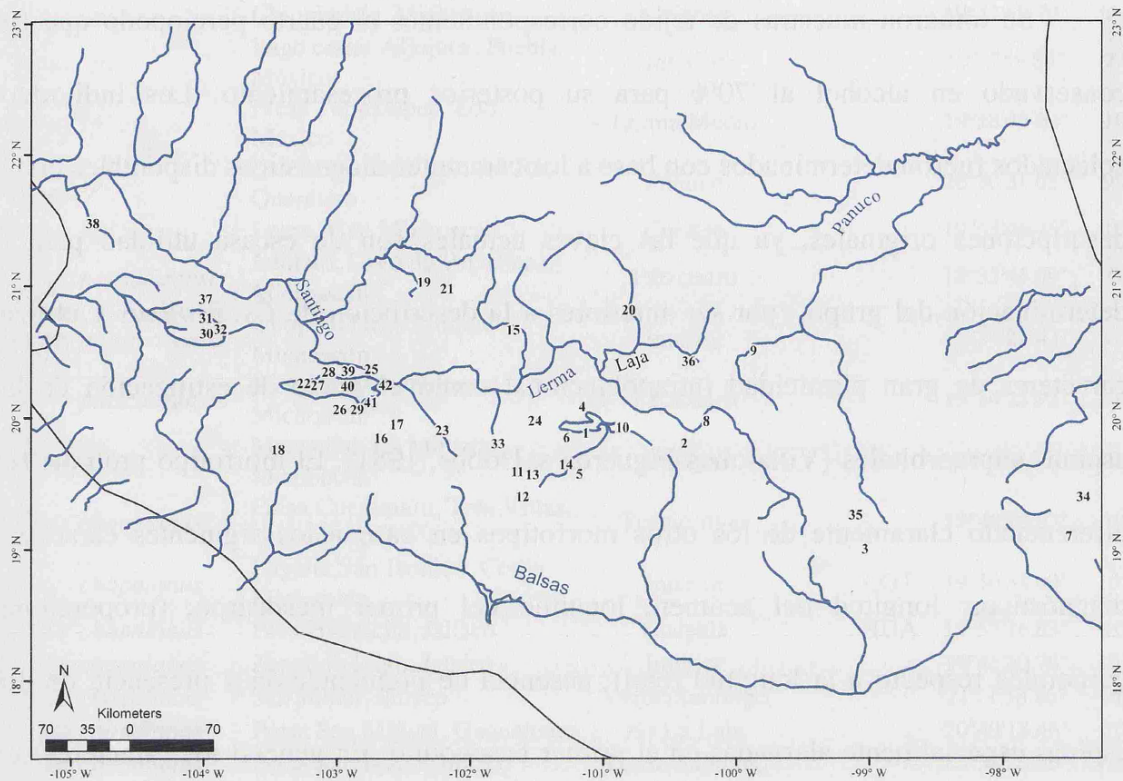


Figura 1. Mapa de localidades contempladas en el análisis filogeográfico del género *Cambarellus* en el centro de México, (nombres de localidades en Tabla 1).

Debido a su demostrada utilidad en estudios filogeográficos (Buhay, 2009; Crandall y Buhay, 2008), dos fragmentos mitocondriales fueron amplificados, el gen 16S y el gen 12S. Los primers empleados fueron para el 16S: 1471-CCTGTTTANCAAAAACAT y 16S-1472- AGATAGAAACCAACCTGG (Crandall y Fitzpatrick Jr, 1996), y para el 12S: 12Sf: GAAACCAGGATTAGATACCC y 12Sr TTTCCCGCGAGCGACGGGCG (Mokady *et al.*, 1999). Estos dos fragmentos han sido considerados como marcadores fiables, ya que no han sido observados los niveles de pseudogenes presentes en otros genes como el Citocromo Oxidasa I. Las amplificaciones fueron llevadas a cabo en reacciones con un volumen de 10 uL con buffer 10x PCR (Biotools), 1.0-2.0 mM de MgCl₂, 2.02 mM de cada primer forward y reverse, 0.1 mM dNTP mix, 0.25 U de Taq DNA polimerasa de Biotools y 1 uL del ADN (a una concentración de 10ng/uL). Los ciclos de amplificación fueron como sigue:

94°C por 5 min; 35 ciclos de 90°C por 1 min, la Tm estandarizada para cada pareja de primers por 45s y 72°C por 1 min; seguido de una extensión final de 7-min a 72°C. Los productos de PCR fueron visualizados en geles de agarosa al 1.0% (1x TBE) y teñidos con SYBR-Safe (Invitrogen). Los fragmentos así amplificados fueron secuenciados en un analizador automático ABI 3730 DNA. Tras una inicial preparación de las secuencias en ficheros y la verificación de los cromatogramas con la utilización del programa Sequencher, Se llevaron a cabo alineamientos por separado de cada fragmento, utilizando el programa MUSCLE (Edgar, 2004).

6.2.1.2 Análisis estadísticos

Se estimó una red de haplotipos de parsimonia utilizando el algoritmo “Median Joining” con el programa Network 4.5 (Bandelt *et al.*, 1999). Este algoritmo permite identificar grupos de haplotipos que comparten similitud y sus posibles conexiones de manera que el arreglo es la solución más parsimoniosa.

El escenario concreto de diferenciación en las poblaciones del lago de Chapala (Grupo Chapala) fue analizado de forma separada. Las nueve poblaciones indicadas en la Figura 2 fueron estudiadas para probar la hipótesis de influencia de dos actores en la diferenciación, el primero determinado por el morfotipo (*prolixus-chapalanus*) y el segundo por los tipos de hábitats (profundidad-litoral-manantial) (ver Figura 2). En el caso de la información mitocondrial se incluyeron además otras poblaciones no utilizadas en el análisis nuclear por no contar con tamaños de muestra adecuados.

La hipótesis nula (diferenciación histórica y posterior contacto secundario) fue probada estimando el grado de diferenciación entre las poblaciones. Para ello se estimaron las Φ_{ST} entre pares de poblaciones con la finalidad de probar explícitamente la hipótesis de organización jerárquica de las poblaciones en morfotipos o en tipos de hábitat, se llevó a cabo un AMOVA (Excoffier *et al.*, 1992), agrupando en función de ambos factores (morfotipos prolixus-chapalanus y habitats profundidad-litoral-manantial). Se utilizó el programa Arlequin ver. 3.11 (Excoffier *et al.*, 2005), y se aplicó la corrección secuencial de Bonferroni para múltiples comparaciones.

Así mismo, una historia demográfica compartida entre morfotipos se esperaría como resultado del flujo génico mantenido en el tiempo, ya que los tamaños de las poblaciones deberían fluctuar en función de las modificaciones climáticas o geográficas en ambos grupos de poblaciones de forma similar y en tiempos también similares. Se probó la posibilidad de movimientos demográficos infiriendo el cambio del tamaño poblacional en el tiempo como función de la diversidad genética y representando estos cambios en un Bayesian Skyline Plot con el programa BEAST 1. 6.0 (Drummond y Rambaut, 2007). Una distribución uniforme fue utilizada como hipótesis previa para las tasas de mutación máxima y mínima, las cuales fueron utilizadas de acuerdo a las tasas reportadas hasta ahora para crustáceos, que para el 16S van de 1.4% PMY (Cook *et al.*, 2008; Knowlton *et al.*, 1993) a 2.6% (Cook *et al.*, 2008; Knowlton *et al.*, 1993) y para el 12S de 1.2% PMY-1.7%.

6.2.2 Genética de poblaciones inferida a través de marcadores nucleares

6.2.2.1 Muestreo

Con la finalidad de evaluar el flujo génico entre morfotipos y entre las poblaciones del grupo Chapala, se llevó a cabo un estudio con marcadores microsatélites que permitiera evaluar eventos de contacto entre poblaciones más reciente. Se llevó a cabo un muestreo intensivo en las poblaciones de la cuenca de Chapala, especialmente en el Lago Chapala y los dos ríos que alimentan al lago, el río Duero y el río Lerma. Dado que el morfotipo *prolixus* ha sido descrito como presente a profundidades mayores de 4m, se consideraron diferentes putos de muestreo a profundidad variable, de 7-10 m (Figura 2). Todas las muestras fueron conservadas y procesadas como en el caso del estudio filogeográfico (ver más arriba).

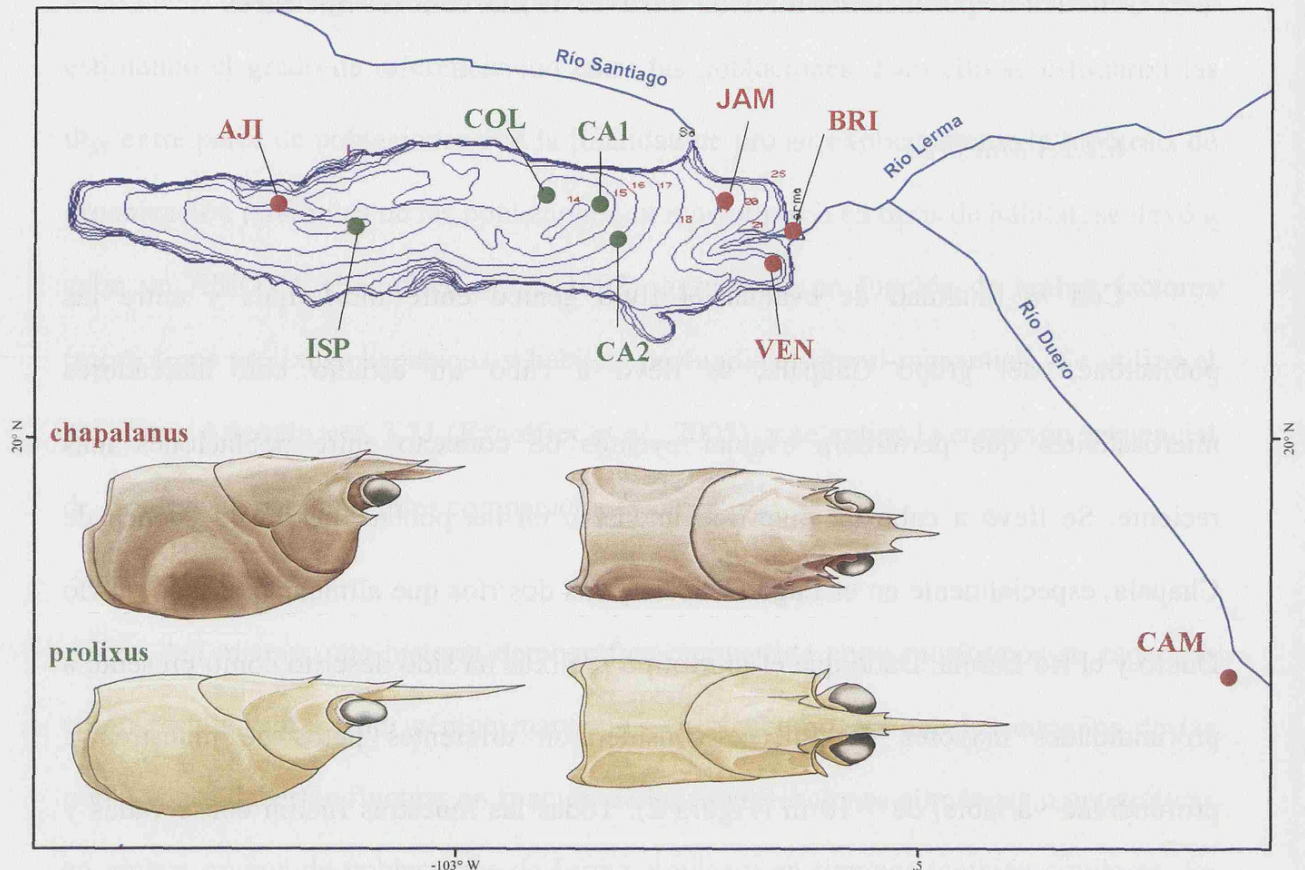


Figura 2. Mapa de las localidades de muestreo en la cuenca de Chapala, utilizadas en el estudio de genética de poblaciones con marcadores microsatélites incluyendo el mapa batimétrico del Lago Chapala (SARH, 1981). Se muestran las características generales de los dos morfotipos encontrados en simpatria en el lago, y las localidades de las que provienen en distintos colores (rojo=*chapanus*, verde=*prolixus*). Las poblaciones del lago en verde corresponden al hábitat de profundidad, mientras que en rojo las correspondientes al hábitat litoral y Camécuaro corresponde a un hábitat de manantial.

6.2.2.2 Loci microsatélites

Fueron utilizados nueve loci polimórficos previamente aislados en *Cambarellus chapalanus* (Capítulo 5 de esta tesis). Las amplificaciones fueron llevadas a cabo en reacciones con un volumen de 10 uL con buffer 10x PCR (Biotools), 1.0-2.0 mM de MgCl₂, 2.02 mM de cada cebador “forward” y “reverse”, 0.1 mM dNTP mix, 0.25 U de

Taq DNA polimerasa de Biotools y 1 uL del ADN (a una concentración de 10ng/uL). Los ciclos de amplificación fueron como sigue: 94°C por 5 min; 35 ciclos de 90°C por 1 min, la T_m estandarizada para cada pareja de primers por 45s y 72°C por 1 min; seguido de una extensión final de 7-min a 72°C. Los primers forward fueron marcados fluorescentemente (Invitrogen), los fragmentos amplificados por PCR fueron analizados y los tamaños obtenidos fueron estimados por comparación con el estándar ROX (Applied Biosystems) mediante electroforesis capilar utilizando secuenciación automática en un secuenciador ABI 3100. Los tamaños de los alelos fueron obtenidos usando GeneMapper 3.7 (Applied Biosystems). Un aproximado del 1% de las muestras fue reanalizado para asegurar la repetibilidad de los métodos de amplificación y determinación del tamaño.

6.2.2.3 Diversidad genética

La diversidad genética fue cuantificada por locus y sitios de muestreo por medio de la estimación del número de alelos por locus (N_A), heterosigocidad observada (H_O), heterosigocidad esperada (H_E) y el número de alelos estandarizado por el de la muestra de menor tamaño (N_S) (Nei y Chesser, 1983), utilizando GENETIX 4.05 (Belkir, 2000) y FSTAT 2.9.3 (Goudet, 2001). Se llevó a cabo la prueba de desviación del equilibrio de Hardy–Weinberg utilizando el test de probabilidad de (Guo y Thompson, 1992), disponible en GENEPOP 4.0.1 (Raymond y Rousset, 1995), haciendo las comparaciones por locus y población. Se probó la existencia de desequilibrio en ligamiento entre cada par de loci, como es estimado por el test exacto de Fisher utilizando el programa GENEPOP 4.0.1. Ambas pruebas, del equilibrio de Hardy–Weinberg y de desequilibrio en ligamiento se llevaron a cabo con inferencia bayesiana,

utilizando cadenas de Markov (con 10000 pasos de dememorización, 1000 grupos, 2000 iteraciones/grupo) (Guo y Thompson, 1992). Todos los valores de P de comparaciones múltiples fueron corregidos utilizando la corrección secuencial de Bonferroni (Rice, 1989).

Se llevó a cabo una prueba estadística bimodal para cada locus y sitios de muestreo para detectar posibles errores de genotipado debido a una posible amplificación preferencial de uno de los dos alelos, tamaños mal asignados durante el genotipado p presencia de alelos nulos utilizando los programas DROPOUT (McKelvey y Schwartz, 2005) y MICRO-CHECKER v2.23 (Van Oosterhout *et al.*, 2004).

6.2.2.4 Diferenciación de las poblaciones y flujo genético

Fueron utilizados los tres métodos generales para evaluar el flujo genético entre poblaciones, es decir, por medio de los estadísticos de F (cuya hipótesis nula es no diferenciación, o flujo genético), métodos de prueba de estructura basados en inferencia bayesiana y métodos de asignación. Para probar la posibilidad de la importancia de la contribución de mutaciones paso a paso (SMM) en la diferenciación en lo loci utilizados, se llevó a cabo el procedimiento de aleatorización del tamaño de los alelos (Hardy *et al.*, 2003). La prueba fue llevada a cabo entre poblaciones para determinar el estadístico adecuado para caracterizar la diferenciación entre muestras, ya que un resultado global significativo sustentaría la utilización de R_{ST} en vez de las más tradicionales medidas de F_{ST} . La significación fue evaluada con 10 000 pasos de aleatorización. Con base en estos resultados, se determinó que las F_{ST} eran más adecuadas que las R_{ST} , ya que la mutación no mostraba un efecto significativo sobre el

cambio en el tamaño de los alelos, sustentando que la variación estaba más relacionada con eventos de deriva hacia cada población (Hardy *et al.*, 2003; Lugon-Moulin *et al.*, 1999).

Dado que las medidas tradicionales de diferenciación y evaluación del flujo génico entre poblaciones como F_{ST} y G_{ST} han sido consideradas como no adecuadas con niveles de diferenciación bajos (Hedrick, 1999; Hedrick, 2005; Heller *et al.*, 2010; Heller y Siegismund, 2009; Jost, 2008; Nagylaki, 1998), las estimas diferenciación fueron hechas considerando las D_{EST} (Jost, 2008), usando el programa SMOGD 1.2.5 (Crawford, 2010). La diferenciación en estas medidas no debe ser tomada como tal, y más bien las tendencias en los resultados a través de las poblaciones son consideradas para evaluar la difreneciación de forma no desviada por los valores mínimos en el total de las muestras, lo cual es generalmente más informativo. Los valores de F_{ST} fueron también estimados con fines de comparación, mediante las estimas basadas en la identidad de los alelos por pares (Weir y Cockerham, 1984), usando el programa Arlequin versión 3.1 (Excoffier *et al.*, 2005).

Con la finalidad de evaluar las hipótesis de estructura genética esperada entre los dos morfotipos (prolixus-chapalanus) y entre diferentes hábitats (profundidad-lacustre-manantial) la significación de la variación molecular fue agrupada en diferentes niveles usando un Análisis Molecular de la Varianza (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992) en el programa Genodive 2.0b17 (Meirmans y Van Tienderen, 2004). Se utilizó estandarización de Meirmans del estadístico F (el cual es ponderado por los valores máximos) (Meirmans, 2006). La significación de los valores de P fue ajustada por la corrección secuencial para pruebas múltiples de Bonferroni (Rice, 1989), con un valor de α de 0.05. La ordenación de la variabilidad entre muestras fue analizada por medio

de un análisis de correspondencia (Guinand, 1996) implementado en el programa Genetix v.4.05.2 (Belkir, 2000).

El flujo genético entre muestras fue inferido por medio de la probabilidad de pertenencia de los individuos a grupos genéticos discretos, con el programa STRUCTURE 2.0 (Pritchard *et al.*, 2000), el cual usa un método de aproximación bayesiana para inferir el número de poblaciones (K) con mejores valores de probabilidad posterior y estimar así el grado de mezcla genética en los individuos que conforman una muestra. Las simulaciones fueron llevadas a cabo bajo un modelo de mezcla y frecuencias alélicas correlacionadas, dado el cercano parentesco de las poblaciones. El procedimiento de cadenas de Markov consistió en de 3×10^6 seguidas de un periodo de dememorización de 3×10^5 . La inferencia del valor de K más probable fue llevada a cabo con cambio en el valor modal de K (Evanno *et al.*, 2005). Se probaron los diferentes valores posibles de K a partir del número de muestras en el análisis (1-10).

Una prueba de asignación bayesiana fue implementada también en el programa GENECLASS 2.0 (Piry *et al.*, 2004a), el cual estima la probabilidad que cada individual posee de pertenecer a la población de referencia. En este caso, con la finalidad de estimar el porcentaje de autoasignación (una medida relativa que puede relacionarse con el grado de aislamiento de una población), las poblaciones de referencias fueron las mismas que las de prueba. En un segundo paso, se probó la asignación a poblaciones de acuerdo al morfotipo observado en cada una (prolixus o chapalanus). El procedimiento siguió el método de exclusión parcial (Rannala y Mountain, 1997), y la simulación consistió de 10,000 individuos.

El flujo genético puede estimarse como resultado del flujo reciente y asimétrico entre poblaciones, así mismo, puede evaluarse de acuerdo al número de individuos que físicamente se trasladan entre poblaciones. Para ambas estimas se utilizaron métodos de coalescencia con el programa BayesAss+ v1.3 (Wilson y Rannala, 2003). Este método estima la proporción de migrantes de una población a otra, para lo cual se diseña una búsqueda por medio de cadenas de Markov e inspección de los valores de Likelihood alcanzados. Se llevaron a cabo cinco búsquedas independientes para asegurar convergencia de parámetros, y posteriormente se aplicó una prueba de máxima verosimilitud para probar la significación de los valores de probabilidad posterior en las tasas de migración (Wilson y Rannala, 2003). La comparación de las tasas de flujo genético obtenidos por BayesAss y el número de migrantes entre poblaciones permitió distinguir entre flujo y dispersión.

... 6.3 RESULTADOS

La red de haplotipos resultante del análisis “median joining network” de todas las poblaciones de *Cambarellus* del centro de México mostró una estructura geográfica (Figura 3). La estructura filogeográfica refleja las principales cuencas de esta región. En este sentido, se diferenciaba como monofilético un grupo de haplotipos separado por una mutación en la posición 269 del gen 16S del resto de haplotipos. Este grupo, en adelante denominado “Grupo Chapala”, contiene a las poblaciones de la cuenca del mismo nombre, que incluye la parte baja del río Lerma, la cuenca del río Duero y el Lago Chapala y sus alrededores. Es en este grupo es donde se encuentran el morfotipo *prolixus*, proveniente exclusivamente de poblaciones del Lago Chapala, y el morfotipo *chapalanus*, proveniente de diferentes poblaciones de escasa profundidad (menos de 4m) del Lago y de los afluentes al mismo.

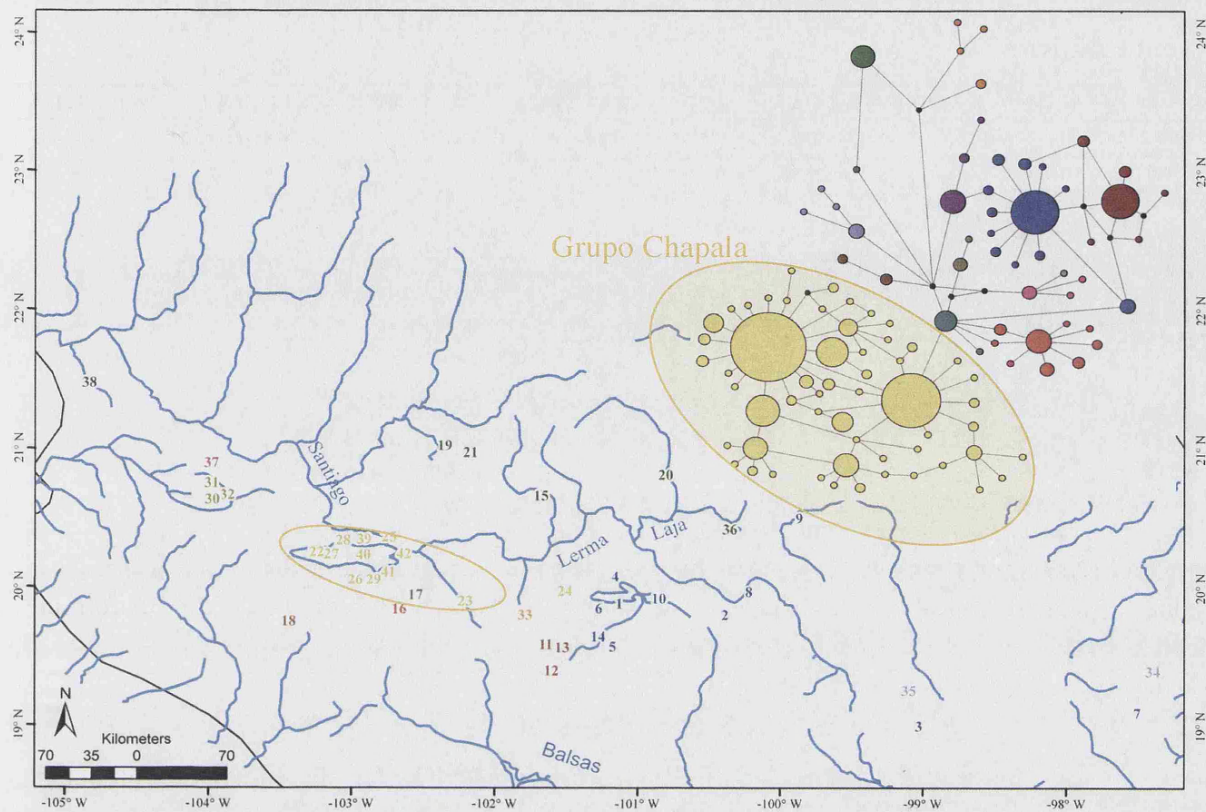


Figura 3. Red de haplotipos construida con el algoritmo “median joining” a partir de la información mitocondrial (genes 12S y 16S) para las poblaciones de *Cambarellus* del centro de México. Colores de acuerdo a la distribución, mostrada en el mapa. En amarillo el grupo de haplotipos Chapala, correspondiente geográficamente a la cuenca de Chapala, y que además incluye a los morfotipos identificados como chapalanus (correspondiente a *Cs. chapalanus*) y proluxus (correspondiente a *Cs. proluxus*).

La diferenciación mitocondrial entre poblaciones del Grupo Chapalanus, medida por medio de las Φ_{ST} , resulta en valores significativos principalmente por la alta diferenciación de las poblaciones del manatíal de Camécuaro y Venustiano Carranza con respecto a varias otras poblaciones (Tabla 2). La población de Cotija, tomada aquí como referencia de una población externa a Chapala presenta diferencias significativas con la mayoría de las poblaciones del Grupo.

Tabla 2. Φ_{ST} entre las poblaciones del grupo Chapala analizadas con el ADN mitocondrial.

	ISP	CAL	COL	CALA	AJI	JAM	BRI	CAM	VEN	COT	LUZ	PAL	HUA
ISP													
CAL	0.047												
COL	0.168	0.224											
CALA	0.050	0.067	0.103										
AJI	0.027	0.007	0.161	0.040									
JAM	0.038	0.005	0.130	0.018	0.007								
BRI	0.073	0.103	0.018	0.022	0.061	0.031							
CAM	0.183	0.236	0.085	0.091	0.175	0.124	0.057						
VEN	0.169	0.209	0.089	0.084	0.144	0.115	0.057	0.070					
COT	0.181	0.273	0.173	0.150	0.206	0.204	0.129	0.161	0.183				
LUZ	0.409	0.524	0.234	0.379	0.443	0.433	0.263	0.378	0.416	0.393			
PAL	0.106	0.171	0.206	0.108	0.053	0.105	0.112	0.206	0.161	0.195	0.567		
HUA	0.346	0.475	0.338	0.308	0.382	0.386	0.282	0.324	0.351	0.314	0.897	0.445	
NEG	0.112	0.027	0.377	0.187	0.077	0.113	0.239	0.393	0.373	0.393	0.754	0.367	0.843

En negritas se muestran los valores significativos después de la corrección de Bonferroni ($P < 0.05$).

El análisis de molecular de la varianza (AMOVA) no mostró evidencias significativas de una estructuración de la variación mitocondrial de acuerdo a morfotipos (Tabla 3). De igual manera, los valores no mostraron significancia cuando el tipo de hábitat era considerado como factor.

Tabla 3. Análisis molecular de la varianza (AMOVA), probando a diferentes hipótesis de arreglo jerárquico en la variación genética mitocondrial de las poblaciones del Grupo Chapala.

Agrupación	Fuente de variación	% variación	Estadístico	E.S.	P
Morfotipos prolixus Vs chapalanus	Dentro poblaciones	79.41	<i>Fis</i>	0.205	0.74386
	Entre poblaciones	14.58	<i>Fsc</i>	0.155	0.13661
	Entre morfotipos	5.99	<i>Fct</i>	0.059	0.05617
Hábitats prolixusVs chapalanusVs Camécuaro	Dentro poblaciones	87.62	<i>Fis</i>	0.212	0.380
	Entre poblaciones	12.73	<i>Fsc</i>	0.123	0.055
	Entre hábitats	0.36	<i>Fct</i>	0.003	0.001

En negritas valores significativos tras la corrección secuencial de Bonferroni ($P < 0.05$). E.S.= error estándar.

Se llevó a cabo una red mitocondrial enfocándose en el Grupo Chapala, con la finalidad de visualizar con más detalle la estructura haplotípica en las poblaciones contenidas en este grupo (Figura 3). Principalmente en esta red puede observarse que las poblaciones de Isla Patos (en rojo oscuro) y Camécuaro (en azul) no comparten haplotipos. Esto podría indicar cierta estructuración entre las poblaciones como respuesta a una limitación ya sea al flujo genético o a la migración.

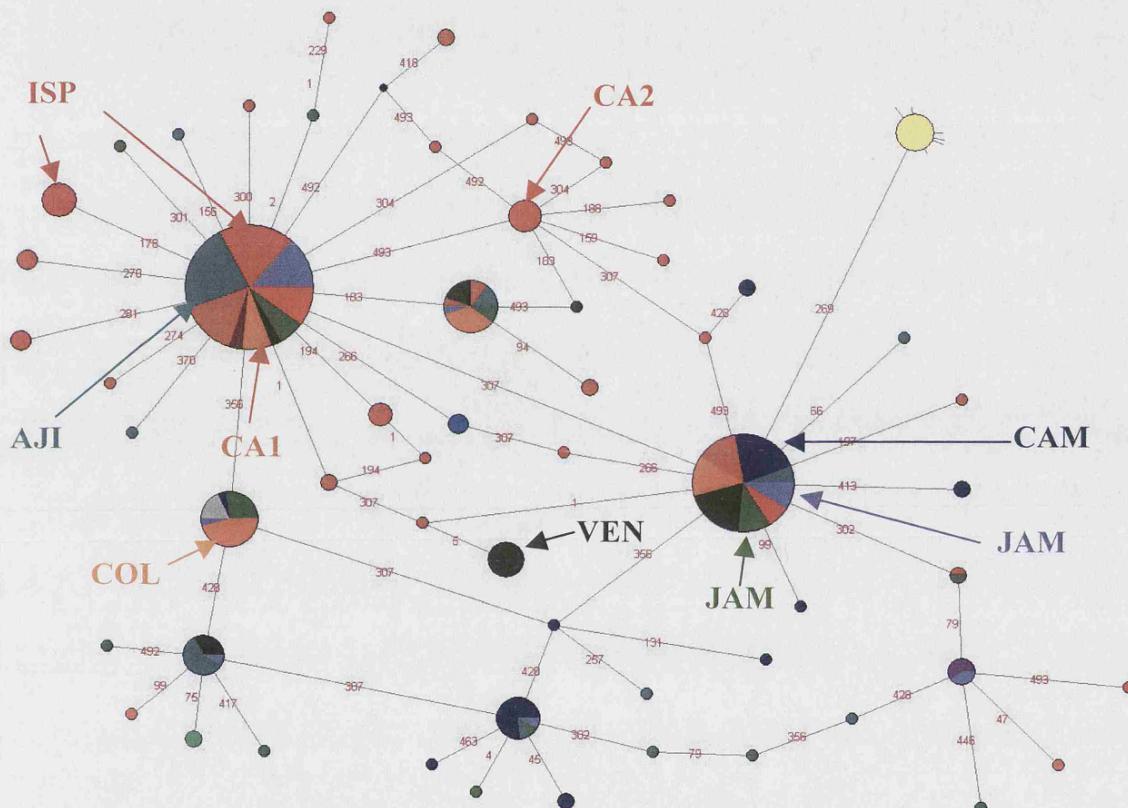


Figura 4. Red de haplotipos mitocondriales del Grupo Chapala (genes 12S y 16S). En rojo oscuro se muestra la población de Isla Patos y en azul la población de Camécuaro, que no comparten haplotipos. Señalados en la red los colores de las poblaciones usadas en el análisis de la diversidad nuclear.

El análisis de Bayesian Skyline Plot permite observar que con la excepción de cuando se considera la totalidad de las poblaciones de *Cambarellus* en el centro de México, el resto de grupos muestran incrementos en el tamaño de la población. En particular, la población de la cuenca de Chapala muestra un incremento a partir de

aproximadamente 0.5 Millones de años (Ma) (mediana = 0.49 ± 0.03) (Figura 5). Un crecimiento un tanto más reciente se observa para el morfotipo prolixus (mediana = , 0.45 ± 0.02) y un tanto más reciente en el morfotipo chapalanus (mediana = , 0.31 ± 0.01). Lo anterior no soporta la hipótesis de una historia demográfica compartida entre los morfotipos chapalanus y prolixus, al no tener movimientos del todo contemporáneos.

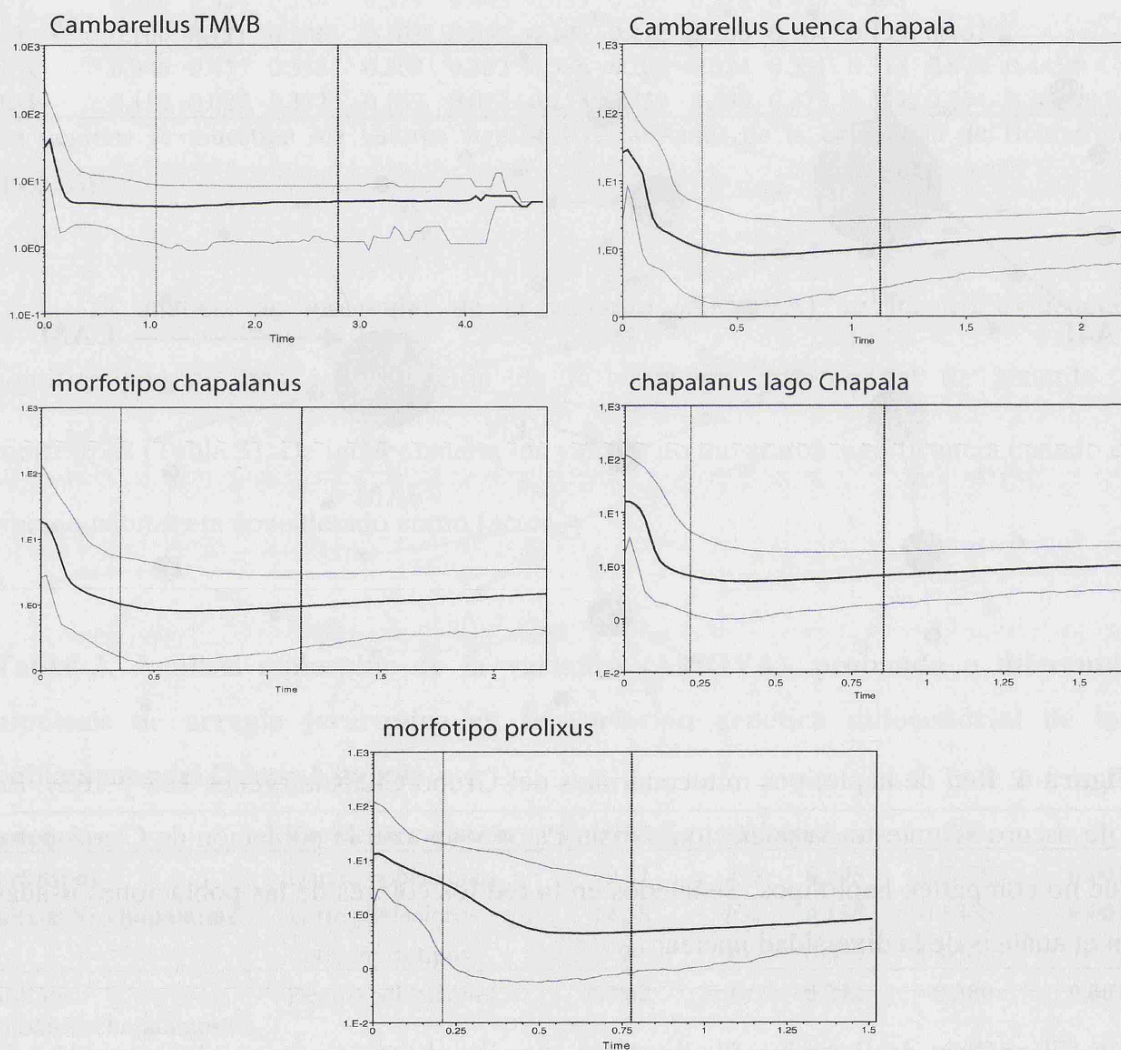


Figura 5. Bayesian Skyline Plots de diferentes grupos mitocondriales en *Cambarellus* del centro de México. La curva se estimó incluyendo además los individuos de morfotipos chapalanus o prolixus, para evaluar la correspondencia entre ambos patrones demográficos.

Los niveles de divergencia de los loci microsatélites fueron altos para la mayoría de los loci, que mostraron de 3 a 18 alelos por locus (media = 10.4 ± 5.4) y las heterozigosidades observada y esperada con valores medios de $H_O = 0.698 \pm 0.244$ y $H_E = 0.532 \pm 0.184$ (Tabla 3). El índice de fijación F_{IS} varió entre -0.088 y 0.512 (media = 0.18 ± 0.24) y dos loci no mostraron conformidad con el equilibrio de Hardy-Weinberg a través de todas las muestras de poblaciones. La prueba de desequilibrio de ligamiento no identificó valores significativos de ligamiento entre ninguna pareja de loci (Tabla 2).

Tabla 4. Principales descriptores de las poblaciones y los loci de las poblaciones de *Cambarellus* estudiadas en la cuenca Chapala.

Población	N	N _A	H _E	H _O	F _{IS}
ISP (P)	31.3	13.0	0.709	0.504	0.233
CA1 (P)	23.9	12.0	0.729	0.509	0.252
COL (P)	28.6	12.0	0.683	0.476	0.221
CA2 (P)	27.0	11.8	0.727	0.505	0.224
AJI (C)	24.0	10.3	0.666	0.460	0.229
JAM (C)	15.8	9.8	0.731	0.580	0.157
BRI (C)	23.6	10.8	0.704	0.513	0.227
CAM (C)	23.4	9.3	0.646	0.593	0.056
VEN (C)	23.3	7.9	0.577	0.413	0.241

Loci	NS	N _A	H _E	H _O	F _{IS}
PL111A	25.667	8.111	0.398	0.740	0.453
PL13A	25.778	11.556	0.782	0.792	0.016
PL22H	21.444	18.000	0.448	0.921	0.512
Came3F	25.444	2.778	0.479	0.446	-0.068
PL17G	25.333	16.889	0.594	0.905	0.347
LD	25.222	2.889	0.189	0.169	-0.088
LQ	25.444	8.111	0.745	0.798	0.023
5B	24.667	12.111	0.650	0.668	0.025
C1	22.667	13.556	0.509	0.847	0.401

N= tamaño de la población; N_A= número total de alelos por locus y número medio de alelos por población, respectivamente; NS= riqueza alélica estandarizada por la muestra más pequeña (9.3) usando el método de rarefacción de FSTAT 2.9.3 (Goudet, 2001) por locus y por población; heterozigosidades medias esperada (*HE*) y observada (*HO*) así como estadístico *FIS* de Wright por locus y población. Valores de *FIS* en negritas son significativos luego de aplicar la corrección secuencial de Bonferroni para pruebas múltiples (Rice, 1989).

No fueron encontrados errores de genotipado relacionados con allele-dropout o problemas de alelos nulos, como lo muestra la prueba bimodal no significativa ($P>0.05$). La mayoría de los valores de diferenciación basados en F_{ST} entre las poblaciones analizadas fueron significativos cuando incluyeron las poblaciones de CAM Y VEN, y en tres casos cuando incluyeron la población de BRI. Los valores de D_{EST} entre poblaciones del mismo morfotipo fueron en general menores a los que comparaban poblaciones de distinto morfotipo (Tabla 1).

Tabla 5. Valores de diferenciación a partir de loci nucleares entre poblaciones del Grupo Chapala.

	ISP	CA1	COL	CA2	AJI	JAM	BRI	CAM	VEN
ISP (P)		0.0025	0.0103	0.0066	0.0603	0.0899	0.1116	0.1003	0.1749
CA1 (P)	0.0000		0.0223	0.0196	0.0315	0.0403	0.1124	0.1008	0.1247
COL (P)	0.0010	0.0040		0.0348	0.0484	0.0702	0.0993	0.1022	0.1508
CA2 (P)	0.0070	0.0000	0.0100		0.0473	0.0446	0.0753	0.0963	0.1240
AJI (C)	0.0190	0.0190	0.0190	0.0120		0.0412	0.0310	0.0642	0.1023
JAM (C)	0.0230	0.0070	0.0240	0.0040	0.0270		0.0555	0.0096	0.0819
BRI (C)	0.0270	0.0250	0.0250	0.0220	0.0290	0.0160		0.0627	0.0910
CAM (C)	0.0440	0.0490	0.0560	0.0440	0.0600	0.0330	0.0330		0.1332
VEN (C)	0.0600	0.0420	0.0560	0.0410	0.0520	0.0330	0.0310	0.0650	

Debajo de la diagonal: valores de F_{ST} , arriba de la diagonal valores de D_{EST} . En negritas se muestran los valores de F_{ST} significativos tras la corrección secuencial de Bonferroni ($P<0.05$).

El AMOVA resultó en una agrupación significativa de la varianza en los casos en que la estructura incluía comparaciones entre individuos o entre poblaciones, pero ninguna hipótesis de agrupación mayor resultó en valores significativos, no soportando que la estructuración de la varianza genética entre morfotipos ni entre posibles hábitats selectivos (profundidad, litoral, manantial).

Tabla 6. AMOVA de loci nucleares, probando diferentes hipótesis de estructuración jerárquica de la variabilidad genética en las poblaciones analizadas.

Agrupado en	Fuente de variación	% variation	F Statistics	SE	P
Población	dentro individuos	72.3	<i>Fit</i> 0.274	0.078	--
	entre individuos	25.1	<i>Fis</i> 0.257	0.082	0.001
	entre poblaciones	2.3	<i>Fst</i> 0.023	0.009	0.001
Población Prolixus Vs chapalanus	dentro individuos	0.723	<i>Fit</i> 0.277	0.079	--
	entre individuos	0.25	<i>Fis</i> 0.257	0.082	0.001
	entre poblaciones	0.018	<i>Fsc</i> 0.018	0.009	0.001
	entre morfotipos	0.008	<i>Fct</i> 0.008	0.005	0.01
Población Profundidad Vs litoral Vs manantial	dentro individuos	0.723	<i>Fit</i> 0.277	0.078	--
	entre individuos	0.25	<i>Fis</i> 0.257	0.082	0.001
	entre poblaciones	0.014	<i>Fsc</i> 0.014	0.008	0.001
	entre grupos	0.013	<i>Fct</i> 0.013	0.007	0.003

En negritas se indican los valores significativos después de la corrección secuencial de Bonferroni ($P < 0.05$).

Un primer análisis de agrupación bayesiana fue llevado a cabo para la identificación del número de poblaciones genéticamente diferenciadas entre las nueve pertenecientes al Grupo Chapala. Este análisis mostró el valor modal de ΔK en $K=2$ (Figura 6), soportando la existencia de dos grupos genéticos (Pritchard *et al.*, 2000). Un segundo análisis consideró la agrupación en dos poblaciones de acuerdo al morfotipo (Figura 6) con la finalidad de evaluar la hipótesis a priori de agrupación de los individuos en categorías genéticas determinadas.

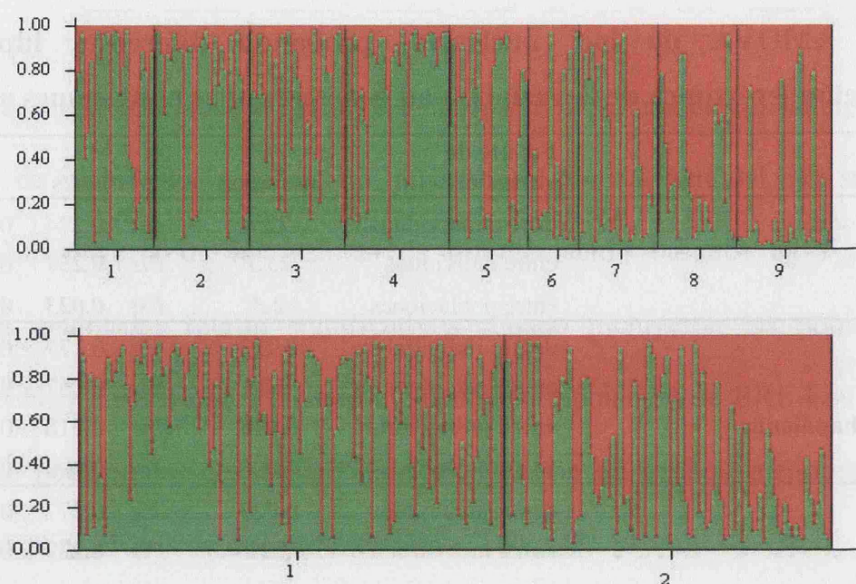


Figura 6. Análisis de agrupación bayesiana basado en loci nucleares, de los individuos de poblaciones de morfotipos prolixus y chapalanus. Arriba se muestra la asignación individual de las nueve muestras por separado (1-4 muestras, de morfotipo prolixus; 5-9, muestras de morfotipo chapalanus), y abajo cuando éstas fueron asignadas a dos grupos en función del morfotipo (1 = prolixus, 2 = chapalanus). La decisión del número de grupos genéticos en cada caso fue basada en la más alta probabilidad posterior, en términos del cambio en K (ΔK), la cual es calculada como la media de los valores de la segunda derivada de $L(K)$ (Evanno *et al.*, 2005). El orden de las muestras sigue el de las tablas de análisis nucleares.

La prueba de asignación por muestras determinó correctamente la población de origen de la mayoría de los individuos (Tabla 7). El valor medio de autoasignación en muestras del morfotipo prolixus fue mayor que el de muestras del morfotipo chapalanus (media = 0.321, ± 0.078 , media = 0.206, ± 0.084 respectivamente). Por otro lado, el promedio de asignación de las muestras del morfotipo prolixus a las del morfotipo chapalanus fue menor que la asignación inversa (media = 0.139 \pm 0.081, 0.239 \pm 0.057 respectivamente).

Tabla 7. Valores medios de asignación de individuos de las poblaciones en filas a las poblaciones en columnas, estimados en GeneClass.

	ISP	CA1	COL	CA2	AJI	JAM	BRI	CAM	VEN
ISP	0.700	0.344	0.215	0.385	0.092	0.153	0.147	0.071	0.137
CA1	0.274	0.713	0.176	0.298	0.067	0.098	0.084	0.040	0.074
COL	0.375	0.375	0.692	0.428	0.168	0.191	0.217	0.119	0.207
CA2	0.378	0.361	0.244	0.815	0.174	0.222	0.206	0.112	0.196
AJI	0.340	0.393	0.238	0.345	0.713	0.168	0.219	0.056	0.229
JAM	0.245	0.183	0.154	0.272	0.089	0.693	0.154	0.129	0.164
BRI	0.185	0.301	0.214	0.286	0.129	0.235	0.706	0.179	0.328
CAM	0.272	0.248	0.234	0.307	0.117	0.350	0.294	0.801	0.304
VEN	0.071	0.115	0.231	0.144	0.216	0.199	0.305	0.258	0.845

En negritas valores medios de asignación de los individuos a sus poblaciones de origen y enmarcados los valores de las poblaciones de cada morfotipo (verde=prolixus, rojo=chapalanus).

La proporción de migrantes fue estimada siguiendo dos esquemas. En primer lugar se estimaron los parámetros de migración entre las muestras (Tabla 8) y en un segundo paso, se estimaron las tasas de migración por morfotipo. La mayoría de los valores significativos involucraron en la estima por muestras por un lado a la muestra ISP como donante de las poblaciones del morfotipo prolixus y de AJI y por otro a la muestra VEN como donante de tres muestras del morfotipo chapalanus (Tabla 8).

Tabla 8. Tasas de migración entre muestras de ambos morfotipos.

	ISP	CA1	COL	CA2	AJI	TAR	BRI	CAM	VEN
ISP	0.931	0.003	0.003	0.004	0.003	0.003	0.003	0.005	0.04
CA1	0.206	0.68	0.005	0.005	0.005	0.006	0.005	0.007	0.077
COL	0.223	0.004	0.677	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.071
CA2	0.218	0.004	0.005	0.8	0.004	0.005	0.004	0.007	0.069
AJI	0.204	0.005	0.005	0.006	0.679	0.006	0.005	0.006	0.081
TAR	0.045	0.008	0.008	0.01	0.007	0.69	0.008	0.011	0.21
BRI	0.055	0.005	0.005	0.005	0.004	0.005	0.679	0.005	0.233
CAM	0.018	0.005	0.005	0.004	0.005	0.005	0.005	0.683	0.266
VEN	0.003	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.002	0.985

El sentido de la migración es de las muestras en columnas a muestras en renglones. En negritas se indican los valores significativos ($P < 0.05$, 10,000 simulaciones), en cursivas se muestran los valores de la población de origen (que se pueden interpretar como de no inmigración) y en color se indican las muestras de un morfotipo (verde=prolixus, rojo=chapalanus).

Las pruebas de asignación y migración por morfotipo sirvieron para comparar migración/asignación y distinguir así entre dispersión y flujo genético, lo cual puede ser evaluado a partir de valores no concordantes (Tabla 9). La no concordancia entre tasas de migración y de asignación provee una estimación de la intensidad del flujo genético entre dos poblaciones (Piry *et al.*, 2004b). En este caso, se encontraron altos niveles de asignación incluso cuando las comparaciones consideraban diferentes morfotipos (Tabla 9). Las tasas de no migración fueron altas en cada morfotipo, sin embargo, las de migración fueron relativamente bajas y bastante más bajas que los valores de asignación correspondientes. Esto puede ser interpretado como una señal de flujo genético, al haber escasa llegada de inmigrantes recientes, sobre todo cuando se considera el morfotipo prolixus como receptor y chapalanus como donante. Lo anterior corresponde con un escenario en el que, aunque físicamente haya pocos migrantes entre los morfotipos, la asignación es mayor, como resultado del flujo genético entre generaciones lo cual suele interpretarse como evidencia de interrupción del flujo genético.

Tabla 9. Tasas de migración entre morfotipos estimadas en BayesAss y valores medios de asignación estimados en GeneClass.

	Prolixus	Chapalanus
Prolixus	0.949/0.735	0.05/0.298
Chapalanus	0.101/0.581	0.898/0.671

Valores a la izquierda denotan tasas de inmigración de morfotipos en columnas a morfotipos en filas. Los valores a la derecha denotan los valores medios de asignación de individuos de morfotipos en filas a morfotipos en columnas. Las tasas de no-migración y valores de auto-asignación están indicados en negritas.

... 6.4 DISCUSIÓN

Diferentes marcadores moleculares suelen proveer de evidencias complementarias de la estructura de las poblaciones en un grupo, lo que permite estudiar cómo los procesos evolutivos a diferentes escalas temporales han moldeado los patrones de heterogeneidad genética (Nguyen y Austin, 2004; Souty-Grosset *et al.*, 1997). Mientras en unos casos los patrones son similares, la discordancia entre sus resultados puede resultar de efectos diferenciales de la deriva y la mutación entre los tipos de marcador usados, o bien, estar sustentada en patrones de dispersión o migración diferenciales (Gouin *et al.*, 2002). Como ha sido observado en otros estudios con cangrejos de río, incluir datos mitocondriales y nucleares para describir la variación genética aporta evidencias valiosas para discernir entre los factores históricos (en el caso de la información mitocondrial) y recientes (con microsatélites) relacionados con la configuración actual de las poblaciones (Crandall *et al.*, 2000; Gouin *et al.*, 2006). Debido a las altas tasas de mutación (Goldstein *et al.*, 1999), los loci microsatélites son marcadores nucleares que han probado ser útiles para detectar flujo genético y la estructura de las poblaciones a escalas temporales muy recientes (Baric *et al.*, 2005; Gouin *et al.*, 2006) y han permitido detectar translocaciones o altas capacidades de dispersión en diferentes especies.

En este trabajo se obtiene evidencia que soporta escenarios evolutivos tanto históricos como recientes acerca de las poblaciones de *Cambarellus* en el centro de México. En primer lugar, la variación mitocondrial permitió identificar un patrón

filogeográfico asociado a las cuencas hidrológicas del centro de México y sustentó la estructura haplotípica diferenciada del Grupo Chapala, que incluye las poblaciones de la actual Cuenca de Chapala con los morfotipos *prolixus* y *chapalanus*. La correspondencia entre estructura filogenética y geográfica ha sido previamente evaluada en el estudio filogenético del género *Cambarellus* (ver Capítulo 3) y en otros estudios con especies de agua dulce habitando la Mesa Central de México. Junto con la actividad volcánica y los cambios estructurales entre las cuencas hidrológicas, eventos climáticos transcurridos a lo largo del plioceno han sido identificados como los principales factores involucrados en la diversificación de estos grupos (Doadrio y Domínguez, 2004; Domínguez-Domínguez *et al.*, 2007). En congruencia con esto, se ha propuesto que los patrones filogeográficos del género se han visto influenciados por la formación de grandes sistemas lacustres hacia finales del Mioceno, inicios del Plioceno (ver Capítulo 4 de esta tesis). Evidencia de la existencia de uno de estos sistemas, el Lago Xalisco, al formarse una depresión en la meseta volcánica como resultado de la actividad tectónica hace 0.5 Ma (de Cserna y Alvarez, 1995), podría explicar la diferenciación del Grupo Chapala. La estructura mitocondrial encontrada en las poblaciones de Camécuaro y Venustiano Carranza podría tener relación con las constantes modificaciones en el régimen hídrico observadas a partir del Pleistoceno en la región, que han podido aislar momentáneamente partes del sistema, y conectarlos repetidamente. Los patrones de estructuración haplotípica sustentan una separación temporal de Camécuaro posiblemente reflejando un aislamiento de la cuenca del río Duero. La progresiva disminución del sistema lacustre de Xalisco hasta la actual configuración de la cuenca de Chapala se ha documentado con evidencia geológica (Fernex *et al.*, 2001) y puede estar relacionado con la separación mitocondrial de la población de Camécuaro. Este aislamiento sin embargo no se sustenta con la información nuclear, al registrar un flujo

genético considerable entre Camécuaro y el lago Chapala, lo que como antes se ha explicado, parece deberse a que una variación genética más reciente pudo ser detectada por los loci microsatélites (Sunnucks, 2000).

La especificidad del hábitat de *prolixus* y el que sea la única especie del género con esta característica, hacen suponer que se trata de una especialización a partir de un antecesor habitante de la zona litoral o de río. Sería esperable entonces que esta especialización se basara en adaptaciones al medio en profundidad. Dadas las condiciones ecológicas de Chapala a esas profundidades (De Anda *et al.*, 1998; De Anda *et al.*, 2000; Fernex *et al.*, 2001), entre otras cosas es posible que las adaptaciones se relacionen con la falta de luz, ya que los cambios morfológicos son similares a los que se observan en especies cavernícolas, como un plan corporal y extremidades alargadas (Buhay y Crandall, 2009; Crandall y Buhay, 2008). Esto sería congruente con la presencia de un ambiente adaptativo para *prolixus*.

Contrario a lo observado con la población de Camécuaro, la información mitocondrial no soporta una diferenciación del morfotipo *prolixus* del resto del Grupo Chapala, sin embargo el previo incremento en el tamaño de la población (hace a partir de 0.5 Ma aproximadamente), puede estar relacionado con una historia evolutiva separada de la población del morfotipo *chapalanus* en el Lago Chapala (si bien la diferencia no es significativa). Contar con una hipótesis temporal plausible de la separación entre ambos morfotipos sería de gran ayuda para el entendimiento de los patrones de variabilidad actuales (Losos y Mahler, 2010) y distinguir finalmente entre la hipótesis de separación incompleta de los linajes (relacionada con divergencia

adaptativa) y la de flujo genético (relacionada con contacto secundario) (Hey, 2006; Hey y Nielsen, 2007).

La evidencia mitocondrial y nuclear es coherente con un menor flujo genético entre muestras de hábitats diferentes que entre muestras de un mismo hábitat. Esto deriva de la observación de que la muestra encontrada a más profundidad (ISP) está diferenciada de las poblaciones de litoral y de la de manantial (BRI, VEN y CAM). Este patrón además es coherente con la existencia de flujo genético intermedio entre hábitats, mientras el resto de poblaciones bien podrían representar una zona de contacto entre ellos. Lo anterior soporta la asunción original de que las condiciones de profundidad en el Lago Chapala representan un hábitat selectivo y además que éste tiene influencia en el aislamiento reproductivo.

El esclarecimiento de los factores ambientales de selección así como los rasgos del morfotipo prolixus sobre los que han actuado constituirían un marco más completo para el estudio de la presencia de divergencia adaptativa en este sistema. Hay un número creciente de estudios que han documentado el papel de la selección natural sobre la especiación en la diversificación intraespecífica, siguiendo mecanismos que relacionan plasticidad morfológica especialmente como la base de selección disruptiva o direccional (Barrett *et al.*, 2008; Schlötterer, 2002; Schluter, 2009; Schluter *et al.*, 2010).

La respuesta a la pregunta de si la interrupción de flujo genético entre ambientes se ha dado o no en simpatría no constituye el objetivo de este trabajo, pero brindaría elementos útiles para una adecuada interpretación de los patrones observados. Los

patrones de variabilidad genética, principalmente los provenientes de la evidencia nuclear, sustentan un grado de diferenciación del morfotipo *prolixus*, que sin embargo mantiene ciertos niveles de flujo genético con otras poblaciones, que disminuye con el cambio en las condiciones ecológicas a aquellas presentes en la zona litoral. Es posible que la cuenca del río Duero haya estado temporalmente aislada y luego por eventos climáticos y/o volcánicos, se haya unido a la cuenca de Chapala nuevamente. La importante actividad tectónica alrededor de la cuenca Chapala durante el Pleistoceno ha sido propuesta como responsable de la actual configuración hidrológica de la cuenca (Fernex *et al.*, 2001) y podría explicar la estructura haplotípica actual.

El intervalo de tiempo de separación entre los grupos *prolixus* y *chapalanus* pudo no ser suficiente para el desarrollo de barreras reproductivas, dando lugar al flujo genético intermedio evidenciado por los patrones de migración entre hábitats. Hoy en día, el contacto secundario y la resultante introgresión extendida entre ambos grupos provoca que los patrones de estructura mitocondrial entre hábitats no sean detectables, pero es probable que las condiciones ecológicas eviten el contacto de las poblaciones en profundidad. Por otra parte, ciertas modificaciones en las condiciones hídricas y batimétricas que se han documentado en Chapala pueden facilitar el contacto entre ambos morfotipos en la historia reciente. Una drástica disminución de la superficie y la capacidad del Lago a consecuencia del cambio en el régimen de afluencia proveniente del río Lerma y de la intensa actividad de extracción de agua para consumo humano se han registrado en el siglo 20, y han resultado en las más fuertes modificaciones en los niveles batimétricos del lago desde el Pleistoceno (De Anda *et al.*, 1998; Fernex *et al.*, 2001; SARH, 1981). Estas modificaciones pueden propiciar las zonas de contacto entre

los morfotipos, y posiblemente sean factores importantes en la estructura de las poblaciones y el flujo genético observado hoy en día.

Un escenario alternativo de hibridación sin divergencia adaptativa sin embargo, no aporta evidencias para explicar la asociación entre la divergencia morfológica de *prolixus*, la diferenciación nuclear y las condiciones de profundidad en que habita, mientras que esta asociación sería fácilmente explicable por un escenario adaptativo relacionado con las condiciones de profundidad específicas del Lago Chapala. La existencia de este mecanismo adaptativo parece necesaria y sería independiente del tiempo en que se ha dado y de la condición de simpatría o no con el morfotipo *chapanus*, que se observa actualmente.

Este estudio soporta un grado de diferenciación entre la población que habita un ambiente específico (ISP) y las del resto de hábitats CAM/VEN y es coherente con que este evento de adaptación se ha dado en escalas históricas y los niveles de flujo genético reciente soportan la idea de una separación genética progresiva de los morfotipos que se corresponde con la progresión entre tipos de hábitat. El patrón de flujo genético intermedio no es un impedimento de la especiación ecológica (Schluter, 2009). Lejos de ello, estudios experimentales han probado que utilizando loci neutrales como los microsatélites, el flujo genético intermedio es un patrón esperable acompañado de selección divergente fuerte y tamaños poblacionales grandes (Thibert Plante y Hendry, 2010).

De este modo, el escenario más coherente involucra ambos modelos de especiación, en el que se observa un proceso de hibridación entre dos entidades genéticas aisladas

temporalmente y unidas con posterioridad. Actualmente el flujo genético observado en parte del intervalo de distribución estaría determinado por condiciones ecológicas contrastantes, y habiendo interrupción de flujo genético no atribuible a mecanismos de aislamiento precigótico, esperables en los mecanismos de especiación alopátrica. La evidencia de este trabajo es coherente con la influencia relativa de ambos modelos de especiación (Schluter, 2009) y representa un escenario de complejidad en que la separación de los fenómenos históricos y recientes es indispensable para el estudio evolutivo de poblaciones naturales (Thibert Plante y Hendry, 2010).

REFERENCIAS

- Bandelt, H., Forster, P., Röhl, A., 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 16, 37.
- Baric, S., Höllrigl, A., Füreder, L., Dalla Via, J., 2005. Mitochondrial and microsatellite DNA analyses of austropotamobius pallipes populations in south tyrol (italy) and tyrol (austria). *Bull. Fr. Pêche Piscic* 376, 599-612.
- Barracough, T., 1998. Revealing the factors that promote speciation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 353, 241-249.
- Barracough, T., Vogler, A., 2000. Detecting the geographical pattern of speciation from species level phylogenies. *Am Nat* 155, 419-434.
- Barrett, R.D.H., Rogers, S.M., Schluter, D., 2008. Natural selection on a major armor gene in threespine stickleback. *Science* 322, 255-257.
- Belkir, K., P. Borsa, L. Chickhi, N. Raufaste and F. Bonhomme (ed.), 2000. *Genetix 4.04 logiciel sous windows tm, pour la génétique des populations*. Université de Montpellier II, Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Montpellier, France.
- Berlocher, S., 1998. Can sympatric speciation via host or habitat shift be proven from phylogenetic and biogeographic evidence. In: Howard, D., SH, B. (Eds.), *Endless forms: Species and speciation*. Oxford University Press, Oxford, pp. 99–113.
- Bernatchez, L., Chouinard, A., Lu, G.Q., 1999. Integrating molecular genetics and ecology in studies of adaptive radiation: Whitefish, coregonus sp., as a case study. *Biol. J. Linn. Soc.* 68, 173-194.
- Brooks, D., McLennan, D., 1991. *Phylogeny, ecology, and behavior: A research program in comparative biology*. University of Chicago press.
- Buhay, J., Crandall, K., 2009. Taxonomic revision of cave crayfish in the genus cambarus, subgenus aviticambarus (decapoda: Cambaridae) with descriptions of two new species, c. Speleocoopi and c. Laconensis, endemic to alabama, USA. *Journal of Crustacean Biology* 29, 121-134.
- Buhay, J.E., 2009. Coi-like” sequences are becoming problematic in molecular systematic and DNA barcoding studies. *Journal of Crustacean Biology* 29, 96-110.

- Cook, B., Pringle, C., Hughes, J., 2008. Phylogeography of an island endemic, the puerto rican freshwater crab (*epilobocera sinuatifrons*). *The Journal of heredity* 99, 157-164.
- Crandall, K., Buhay, J., 2008. Global diversity of crayfish (astacidae, cambaridae, and parastacidae—decapoda) in freshwater. *Freshwater Animal Diversity Assessment*, 295-301.
- Crandall, K.A., Bininda-Emonds, O.R.P., Mace, G.M., Wayne, R.K., 2000. Considering evolutionary processes in conservation biology. *Trends Ecol. Evol.* 15, 290-295.
- Crandall, K.A., Fitzpatrick Jr, J.F., 1996. Crayfish molecular systematics: Using a combination of procedures to estimate phylogeny. *Syst. Biol.* 45, 1.
- Crawford, N., 2010. Smogd: Software for the measurement of genetic diversity. *Molecular Ecology Resources* 10, 556-557.
- De Anda, J., Quiñones-Cisneros, S., French, R., Guzman, M., 1998. Hydrologic balance of lake chapala(mexico). *Journal of the American Water Resources Association* 34, 1319-1331.
- De Anda, J., Shear, H., Maniak, U., Riedel, G., 2000. Phosphorus balance in lake chapala (mexico). *J. Great Lakes Res.* 26, 129-140.
- de Cserna, Z., Alvarez, R., 1995. Quaternary drainage development in central mexico and the threat of an environmental disaster; a geological appraisal. *Environmental and Engineering Geoscience* 1, 29-34.
- Doadrio, I., Domínguez, O., 2004. Phylogenetic relationship within the fish family goodeidae based on cytochrome b sequence data. *Mol. Phylogen. Evol.* 31, 416-430.
- Domínguez-Domínguez, O., Boto, L., Alda, F., De León, G.P.P., Doadrio, I., 2007. Human impacts on drainages of the mesa central, mexico, and its genetic effects on an endangered fish, *zoogoneticus quitzeoensis*. *Conserv. Biol.* 21, 168-180.
- Drummond, A., Rambaut, A., 2007. Beast: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol. Biol.* 7, 214.
- Edgar, R.C., 2004. Muscle: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucl. Acids Res.* 32, 1792-1797.
- Evanno, G., Regnaut, S., Goudet, J., 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: A simulation study. *Mol. Ecol.* 14, 2611-2620.

- Excoffier, L., Laval, G., Schneider, S., 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1, 47-50.
- Excoffier, L., Smouse, P.E., Quattro, J.M., 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes - application to human mitochondrial-DNA restriction data. *Genetics* 131, 479-491.
- Fernex, F., Zárate-del Valle, P., Ramírez-Sánchez, H., Michaud, F., Parron, C., Dalmaso, J., Barci-Funel, G., Guzman-Arroyo, M., 2001. Sedimentation rates in lake chapala (western mexico): Possible active tectonic control. *Chem. Geol.* 177, 213-228.
- Foitzik, S., Bauer, S., Laurent, S., Pennings, P., 2009. Genetic diversity, population structure and sex-biased dispersal in three co-evolving species. *J. Evol. Biol.* 22, 2470-2480.
- Futuyma, D.J., Mayer, G.C., 1980. Non-allopatric speciation in animals. *Systematic Zoology* 29, 254-271.
- Goldstein, D.B., Roemer, G.W., Smith, D.A., Reich, D.E., Bergman, A., Wayne, R.K., 1999. The use of microsatellite variation to infer population structure and demographic history in a natural model system. *Genetics* 151, 797-801.
- Goudet, J., 2001. Fstat, a programme to estimate and test gene diversities and fixation indices, version 2.9.3. Available from: <http://www.Unil.Ch/izea/software/fstat.Html>.
- Gouin, N., Grandjean, F., Souty-Grosset, C., 2006. Population genetic structure of the endangered crayfish *austropotamobius pallipes* in france based on microsatellite variation: Biogeographical inferences and conservation implications. *Freshwat. Biol.* 51, 1369-1387.
- Gouin, N., Souty-Grosset, C., Ropiquet, A., Grandjean, F., 2002. High dispersal ability of *austropotamobius pallipes* revealed by microsatellite markers in a french brook. *Bull. Fr. Pêche Piscic* 367, 681-689.
- Gould, S., Lewontin, R., 1979. The spandrels of san marco and the panglossian paradigm: A critique of the adaptationist programme. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 205, 581-598.
- Guinand, B., 1996. Use of a multivariate model using allele frequency distributions to analyse patterns of genetic differentiation among populations. *Biol. J. Linn. Soc.* 58, 173-195.

- Guo, S.W., Thompson, E.A., 1992. Performing the exact test of hardy-weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* 48, 361-372.
- Hardy, O., Charbonnel, N., Fréville, H., Heuertz, M., 2003. Microsatellite allele sizes: A simple test to assess their significance on genetic differentiation. *Genetics* 163, 1467.
- Hedrick, P., 1999. Perspective: Highly variable loci and their interpretation in evolution and conservation. *Evolution* 53, 313-318.
- Hedrick, P.W., 2005. A standardized genetic differentiation measure. *Evolution* 59, 1633-1638.
- Heller, R., Okello, J.B.A., Siegismund, H., 2010. Can small wildlife conservancies maintain genetically stable populations of large mammals? Evidence for increased genetic drift in geographically restricted populations of cape buffalo in east africa. *Mol. Ecol.* 19, 1324-1334.
- Heller, R., Siegismund, H.R., 2009. Relationship between three measures of genetic differentiation g_{st} , d_{est} and g'_{st} : How wrong have we been? *Mol. Ecol.* 18, 2080-2083.
- Hendry, A., Taylor, E., 2004. How much of the variation in adaptive divergence can be explained by gene flow? An evaluation using lake-stream stickleback pairs. *Evolution* 58, 2319-2331.
- Hey, J., 2006. Recent advances in assessing gene flow between diverging populations and species. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 16, 592-596.
- Hey, J., Nielsen, R., 2007. Integration within the felsenstein equation for improved markov chain monte carlo methods in population genetics. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 2785-2790.
- Jiggins, C., Naisbit, R., Coe, R., Mallet, J., 2001. Reproductive isolation caused by colour pattern mimicry. *Nature* 411, 302-305.
- Jost, L., 2008. G_{st} and its relatives do not measure differentiation. *Mol. Ecol.* 17, 4015-4026.
- Knowlton, N., Weigt, L.A., Solorzano, L.A., Mills, D.K., Bermingham, E., 1993. Divergence in proteins, mitochondrial DNA, and reproductive compatibility across the isthmus of panama. *Science* 260, 1629.
- Losos, J., 2000. Ecological character displacement and the study of adaptation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 5693.

- Losos, J., Mahler, D., 2010. Adaptive radiation: The interaction of ecological opportunity, adaptation, and speciation. In: Bell, A.M., DFutuyma D.J, Eanes W.F., Levinton J. (Eds.), *Evolution since darwin: The first 150 years*. Sinauer Associates, Inc.
- Lugon-Moulin, N., Brunner, H., Balloux, F., Hausser, J., Goudet, J., 1999. Do riverine barriers, history or introgression shape the genetic structuring of a common shrew (*sorex araneus*) population? *Heredity* 83, 155-161.
- Mayr, E., 1963. *Animal species and evolution*. Harvard University Press Cambridge, MA.
- McKelvey, K.S., Schwartz, M.K., 2005. Dropout: A program to identify problem loci and samples for noninvasive genetic samples in a capture-mark-recapture framework. *Mol. Ecol. Notes* 5, 716-718.
- Meirmans, P., 2006. Using the amova framework to estimate a standardized genetic differentiation measure. *Evolution* 60, 2399-2402.
- Meirmans, P.G., Van Tienderen, P.H., 2004. Genotype and genodive: Two programs for the analysis of genetic diversity of asexual organisms. *Mol. Ecol. Notes* 4, 792-794.
- Mokady, O., Loya, Y., Achituv, Y., Geffen, E., Graur, D., Rozenblatt, S., Brickner, I., 1999. Speciation versus phenotypic plasticity in coral inhabiting barnacles: Darwin's observations in an ecological context. *J. Mol. Evol.* 49, 367-375.
- Nagylaki, T., 1998. Fixation indices in subdivided populations. *Genetics* 148, 1325.
- Nei, M., Chesser, R., 1983. Estimation of fixation indices and gene diversities. *Annals of Human Genetics* 47, 253-259.
- Nguyen, T., Austin, C., 2004. Inheritance of molecular markers and sex in the australian freshwater crayfish, *cherax destructor clark*. *Aquacult. Res.* 35, 1328-1338.
- Nijhout, H., 2003. Development and evolution of adaptive polyphenisms. *Evolution & Development* 5, 9-18.
- Pedraza-Lara, C., Alda, F., Carranza, S., Doadrio, I., 2010. Mitochondrial DNA structure of the iberian populations of the white-clawed crayfish, *austropotamobius italicus italicus* (faxon, 1914). *Mol. Phylogen. Evol.* In press.
- Pfennig, D.W., Wund, M.A., Snell-Rood, E.C., Cruickshank, T., Schlichting, C.D., Moczek, A.P., 2010. Phenotypic plasticity's impacts on diversification and speciation. *Trends Ecol. Evol.* 25, 459-467.

- Piry, S., Alapetite, A., Cornuet, J., Paetkau, D., Baudouin, L., Estoup, A., 2004a. GeneClass2: A software for genetic assignment and first-generation migrant detection. *Journal of Heredity* 95, 536.
- Piry, S., Alapetite, A., Cornuet, J.M., Paetkau, D., Baudouin, L., Estoup, A., 2004b. GeneClass2: A software for genetic assignment and first-generation migrant detection. *Journal of Heredity* 95, 536-539.
- Platt, J.R., 1964. Strong inference: Certain systematic methods of scientific thinking may produce much more rapid progress than others. *Science* 146, 347-353.
- Pritchard, J.K., Stephens, M., Donnelly, P., 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155, 945-959.
- Rannala, B., Mountain, J.L., 1997. Detecting immigration by using multilocus genotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 9197-9201.
- Raymond, M., Rousset, F., 1995. An exact test for population differentiation. *Evolution* 49, 1280-1283.
- Rice, W.R., 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 43, 223-225.
- Rundle, H., Nosil, P., 2005. Ecological speciation. *Ecol. Lett.* 8, 336-352.
- SARH, 1981. Estudio batimétrico del lago de Chapala. Centro de Estudios Limnológicos. Comisión Nacional del Agua, km. 11 Carr. Guadalajara-Chapala. Jalisco, México.
- Schlötterer, C., 2002. Towards a molecular characterization of adaptation in local populations. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12, 683-687.
- Schluter, D., 2000. Ecology of adaptive radiation. Oxford.
- Schluter, D., 2001. Ecology and the origin of species. *Trends Ecol. Evol.* 16, 372-380.
- Schluter, D., 2009. Evidence for ecological speciation and its alternative. *Science* 323, 737.
- Schluter, D., Marchinko, K., Barrett, R., Rogers, S., 2010. Natural selection and the genetics of adaptation in threespine stickleback. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 365, 2479.
- Schluter, D., McPhail, J.D., 1993. Character displacement and replicate adaptive radiation. *Trends Ecol. Evol.* 8, 197-200.
- Souty-Grosset, C., Grandjean, F., Raimond, R., Frelon, M., Debenest, C., Bramard, M., 1997. Conservation genetics of the white-clawed crayfish *Austropotamobius pallipes*: The usefulness of the mitochondrial DNA marker. *Bull. Fr. Pêche Piscic.*, 677-692.

- Sunnucks, P., 2000. Efficient genetic markers for population biology. *Trends Ecol. Evol.* 15, 199-203.
- Thibert Plante, X., Hendry, A., 2010. When can ecological speciation be detected with neutral loci? *Mol. Ecol.* 19, 2301-2314.
- Turelli, M., Barton, N.H., Coyne, J.A., 2001. Theory and speciation. *Trends Ecol. Evol.* 16, 330-343.
- Van Oosterhout, C., Hutchinson, W.F., Wills, D.P.M., Shipley, P., 2004. Micro-checker: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol. Ecol. Notes* 4, 535-538.
- Villalobos-Figueroa, A., Hobbs, H.H.J., 1981. A new dwarf crayfish from the pacific versant of México (Decapoda:Cambaridae). *Proc. Biol. Soc. Wash.* 94, 492-502.
- Weir, B.S., Cockerham, C.C., 1984. Estimating f-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38, 1358-1370.
- Wilson, G.A., Rannala, B., 2003. Bayesian inference of recent migration rates using multilocus genotypes. *Genetics* 163, 1177-1191.

III. DISCUSIÓN GENERAL

.....

III.1 EL ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD Y LA ESPECIACIÓN A DIFERENTES

ESCALAS EVOLUTIVAS

La comprensión de cómo se origina y evoluciona la diversidad es el objetivo central de la biología evolutiva. En esta tesis, se han intentado resolver distintas preguntas evolutivas que implican diferentes niveles en los que los mecanismos evolutivos pueden ser estudiados, desde a nivel de poblaciones como filogenéticos. Por tanto, es especialmente importante determinar las unidades a las cuales la evolución puede ser descrita, lo cual requiere de considerar algunos conceptos previos en consecuencia. En este sentido, al conformarse por distintas escalas del estudio evolutivo, esta tesis se utilizan las características de diferentes conceptos de especie, ya que de la multitud de conceptos propuestos, ninguno aplica de manera adecuada a todos los niveles involucrados en esta tesis. Primero, en el concepto biológico de especie (Mayr, 1995): “especies son grupos de poblaciones que se reproducen entre sí y que están reproductivamente aisladas de otros grupos similares”, es decir, toda unidad evolutiva aislada genéticamente de forma significativa (Coyne and Orr, 2004).

El adoptar el concepto biológico de especie implica que la especiación puede identificarse con los patrones microevolutivos o de poblaciones, con base en la evolución de mecanismos de aislamiento reproductivo, entendido como la ausencia o restricción del flujo genético entre poblaciones cuyos miembros están en contacto, que esencialmente no llevan a cabo intercambio génico en algún grado. Sin embargo, el adoptar esta definición no implica que el aislamiento reproductivo sea esencial para la divergencia morfológica, ecológica o genética, o que estos aspectos sean menos

importantes en el origen de la diversidad biológica (Turelli et al., 2001), sin embargo no considera la relevancia que en la diversificación pueden tener estos aspectos biológicos de los organismos, que como se ha demostrado, ha sido importante en la adquisición de aislamiento reproductivo en varios grupos de organismos. Es por lo anterior, que es necesario hacer referencia a el concepto ecológico de especie, ya que recupera la importancia que los fenómenos adaptativos pueden tener sobre la especiación: “una especie es un linaje (o un conjunto de linajes cercanos) que ocupa una zona adaptativa mínimamente diferente de aquella de cualquier otro linaje en su distribución, el cual evoluciona separadamente de todos los linajes fuera de su distribución” (Van Valen, 1976).

Cuando se considera una escala macroevolutiva sin embargo, otra característica es necesaria, relacionada con la definición de la especiación a escalas temporales mayores y por ende, con el concepto genealógico de especie (Baum and Donoghue, 1995; Shaw, 1998): “una especie es un grupo exclusivo de organismos cuyos genes coalescen más recientemente entre sus miembros que con miembros de otros organismos fuera de ese grupo, y que no contiene un grupo no exclusivo” (es decir, un grupo definido por su ancestría y monofilia). Este concepto es especialmente importante cuando se estudian los patrones de diversificación entre linajes. El estudio de estas características en grupos de cangrejos de río representativos constituyó un objetivo central de esta tesis.

III.2 PATRONES DE EVOLUCIÓN

III.2.1 PATRONES MICROEVOLUTIVOS

III.2.1.1 *Variación mitocondrial, filogeografía y genética de poblaciones*

En esta tesis los procesos de anagénesis abordados se relacionan con la variabilidad genética en dos grupos de cangrejos de río, lo que permitió identificar la importancia de las fuerzas que la determinan. La deriva, en ambos casos, resultó la fuerza que mediaba principalmente la diferenciación entre entidades evolutivas. En un primer caso, el estudio filogeográfico permitió identificar la relación entre los patrones de variabilidad genética con las variaciones climáticas en un contexto geográfico.

Este estudio describe la estructura mitocondrial de las poblaciones ibéricas del cangrejo de río *Austropotamobius italicus* en un contexto filogeográfico y teniendo en cuenta la variación genética del taxón, distribuido en la parte sur de Europa. Las hipótesis sub-específicas fueron soportadas parcialmente, y una estructura genética relacionada con los fenómenos climáticos se postula como el principal factor explicativo de su variación. Debido a un muestreo más amplio y una estrategia de secuenciación, dos diferentes linajes mitocondriales fueron encontrados en la Península Ibérica, y la variación de haplotipos de la población se observó en una medida considerable con respecto a lo reportado de su rango de distribución. Esta evidencia, junto con la datación de eventos de expansión demográfica durante el Pleistoceno (~ 10.772-20.004 YBP), así como el tiempo de separación de la población italiana anterior al último máximo glacial ($T = 34.858$ años) sugieren que su presencia actual en el la

Península Ibérica podría explicarse por una combinación de diferentes historias de dispersión y complejos escenarios biogeográficos. Este estudio propone que, si bien son posibles, las traslocaciones realizadas por el hombre no siempre deben ser propuestas para explicar los patrones complejos de distribución de especies que han sido fuertemente afectadas por fenómenos climáticos recientes. Otros estudios filogeográficos en cangrejos de río han señalado también la importancia de los cambios climáticos sobre la estructura haplotípica, en especial los cambios climáticos ocurridos durante el pleistoceno que parecen explicar los patrones filogeográficos de algunas especies de los géneros *Enageus* en Australia, *Astacus* y *Austropotamobius* en Europa y *Cambarus* y *Orconectes* en Estados Unidos (Alaranta et al., 2006; Baric et al., 2005; Beroiz et al., 2008; Buhay and Crandall, 2005; Fetzner Jr and Crandall, 2003; Fratini et al., 2005; Gouin et al., 2003; Grandjean et al., 2001; Iaconelli, 2001; Largiader et al., 2000; Pedraza-Lara et al., 2010; Ponniah and Hughes, 2004; Santucci et al., 1997; Schultz et al., 2009; Shull et al., 2005; Trontelj et al., 2005; Zaccara et al., 2004).

En un estudio posterior, se identificaron los principales factores que han contribuido a la variabilidad genética reciente entre diferentes poblaciones del cangrejo de río *Austropotamobius italicus* en España. Las inferencias de la proporción de migración entre algunas poblaciones es coherente con el mantenimiento de flujo genético, especialmente relacionado con el contacto entre una población (La Rioja) y varias más, al ser la población de La Rioja en la cuenca del Ebro una fuente de migrantes para otras poblaciones. Este resultado puede ser explicado por los esfuerzos realizados para evitar la extinción del cangrejo de río en otras localidades y que dan lugar a frecuentes traslocaciones, una práctica común en diferentes sitios de Europa, incluida España (Gil-Sánchez and Alba-Tercedor, 2006; Machino et al., 2004).

La traslocación y refundación de poblaciones puede ser una práctica relativamente habitual en las medidas de conservación de esta especie emblemática (Gil-Sánchez and Alba-Tercedor, 2006; Machino et al., 2004). La especie *A. italicus* (junto con su especie hermana *A. pallipes*) es emblemática para la conservación de cangrejos de río debido a la dramática reducción de su distribución y constituye uno de los ejemplos más claros del efecto que las especies introducidas pueden tener sobre las nativas (Coblentz, 1990; Diéguez-Urbeondo, 2006; Gozlan, 2008). En toda Europa, la problemática de conservación de esta especie ha merecido medidas similares (Alaranta et al., 2006; Baric et al., 2005; Gouin et al., 2006; Grandjean et al., 2000) y posiblemente en España ha dejado su huella en el paisaje genético observado actualmente.

III.2.1.2 Procesos de diferenciación: importancia de la deriva y el flujo genético

De entre los diferentes procesos que estructuran la diversidad genética en cangrejos de río, los procesos de deriva fueron identificados como decisivos en la estructura genética de las poblaciones de cangrejo de río analizadas. En la ausencia de otras fuerzas evolutivas involucradas, el flujo génico entre poblaciones resultará en homogeneidad genética. Sin embargo, la deriva provoca que poblaciones aisladas se diferencien genéticamente con el tiempo. La divergencia entre sub-poblaciones es una consecuencia del balance entre los efectos del flujo genético que las hacen similares y los de la deriva, fuente de la divergencia entre ellas (Allendorf and Luikart, 2007). Existen tres modelos básicos que constituyen una simplificación útil para el estudio mucho más complejo de las interacciones genéticas en poblaciones naturales. El modelo de migración de isla (Wright, 1969) asume que cada subpoblación intercambia migrantes

con la misma probabilidad. Otro modelo de migración es el de paso a paso, en el que la migración entre subpoblaciones disminuye con la distancia entre ellas (Kimura and Ohta, 1978). En general la migración en este modelo es menos efectiva sobre la diferenciación genética, además de corresponder generalmente con un patrón de aislamiento por distancia (Allendorf and Luikart, 2007). El tercer modelo es el de distribución continua, en el que las barreras al flujo genético no son evidentes a lo largo de grandes contextos geográficos, y en el que se define el concepto de “vecindario”, considerado como la extensión en la que los individuos conforman una población panmíctica (Manel et al., 2003).

A diferencia de la mutación, las variables genéticas involucradas en la demografía parecen afectar el paisaje genético de las poblaciones (Allendorf and Luikart, 2007). Lo anterior puede identificarse con un alto nivel de flujo genético, posiblemente relacionado con la capacidad de dispersión (Allendorf and Luikart, 2007; Gouin et al., 2002; Largiader et al., 2000). Algunas propiedades biológicas de los cangrejos de río pueden facilitar la dispersión y el contacto entre poblaciones, como la capacidad de invadir nuevos hábitat en algunos casos, y en otros una importante plasticidad en atributos ecológicos, como la tolerancia fisiológica a condiciones ambientales y la plasticidad morfológica asociada (McMahon, 2002; Nyström, 2002; Vogt, 2002).

Sin embargo, la facilidad para la dispersión de este grupo no evitó la diferenciación de dos grupos genéticos bien diferenciados de *A. italicus* en España, y distribuidos diferencialmente, uno asociado al norte y noreste de España y otro al sur y levante. La mayor parte del contacto entre poblaciones se da en la región sur, lo que, a

falta de explicaciones biogeográficas satisfactorias, probablemente sea debido a introducciones realizadas por el hombre. Esto sin embargo no implica un origen no autóctono de estas poblaciones, sino simplemente una mayor mezcla entre las mismas en determinadas regiones.

La deriva fue importante también en el estudio de la diferenciación genética entre morfotipos del género *Cambarellus*, del centro de México. Una importante cantidad de flujo genético también fue determinante, al darse entre las poblaciones genéticamente diferenciadas de cangrejo de río del lago de Chapala poco entendible. Este estudio cumple con tres de las condiciones propuestas para identificar divergencia adaptativa (Schluter, 2000): 1) origen común de los morfotipos; 2) divergencia rápida entre ellos; 3) diferenciación genética entre los morfotipos, que fue observada parcialmente en esta tesis. La estructura genética identificada en este estudio es más coherente con el modelo de migración paso a paso, en el que la migración y el flujo genético aumenta con la distancia entre las poblaciones, como resultado de aislamiento reproductivo incompleto.

La teoría de divergencia adaptativa predice que el aislamiento reproductivo evoluciona a consecuencia de la adaptación a diferentes nichos ecológicos (Schluter, 2000). Las radiaciones adaptativas se caracterizan por niveles elevados de divergencia entre taxa como respuesta a la acción de la selección natural de manera direccional en rasgos ecológicamente relevantes. De hecho, el campo de estudio en la divergencia adaptativa ha ido en aumento y ha verificado la importancia de ésta cuando hay alta divergencia fenotípica y rápida especiación (revisados en (Albertson and Kocher, 2006; Kobl Müller et al., 2008; Schluter et al., 2010). Evidencias de divergencia adaptativa se

han documentado en grupos de invertebrados como en anfípodos del Lago Baikal (Takhteev et al., 2000), en lapas del lago Ohrid (Albrecht et al., 2006), gasterópodos de los lagos Malili en Silawesi (Strong and Glaubrecht, 2008; Von Rintelen et al., 2004), cangrejos de los grandes lagos Africanos (Marijnissen et al., 2009) y langostinos (Fryer, 2006).

Las evidencias colectadas en esta tesis soportan un caso en que la divergencia observada entre dos especies hermanas puede estar relacionada a adaptación a diferentes condiciones ecológicas, es decir, soporta un caso de divergencia adaptativa. De ser corroborado, se trataría del primer caso descrito de divergencia adaptativa en cangrejos de río (Astacoidea), y junto a la diferenciación en cangrejos y en langostinos africanos, uno de los pocos casos descritos en el orden Decapoda y en invertebrados en general. Lo anterior no quiere decir que haya razones genéticas para ello, sino resultado de que los estudios de diversificación son mucho más abundantes en vertebrados.

Esta tesis provee evidencia que soporta que la especiación alopátrica, entendida como divergencia por deriva y mutación en alopatría, es el patrón de diversificación más importante en los grupos de cangrejo de río estudiados. La divergencia adaptativa sería observada como poco frecuente, ya que no hay evidencia que sustente que la aceleración en la tasa de cladogenésis tenga carácter adaptativo. Dado que los casos en los que se presenta pueden ser muy específicos, la presencia de patrones adaptativos debería ser evaluada correctamente en los diferentes grupos de cangrejos de río que muestren las evidencias que sugieran su existencia, y tras incluir un muestreo completo y con las herramientas técnicas y metodológicas que permitan su distinción

Este estudio soporta un grado de diferenciación entre tipos de hábitat dentro del lago Chapala y es coherente con que este evento de adaptación se ha dado en escalas históricas y los niveles de flujo genético reciente soportan la idea de una separación genética progresiva de los morfotipos que se corresponde con la progresión entre tipos de hábitat. El patrón de flujo genético intermedio no es un impedimento para la especiación ecológica (Schluter, 2009). Lejos de ello, estudios experimentales han probado que utilizando loci neutrales como los microsatélites, el flujo genético intermedio es un patrón esperable acompañado de selección divergente fuerte y tamaños poblacionales grandes (Thibert Plante and Hendry, 2010).

De este modo, el escenario más coherente en las poblaciones de cangrejos de río del lago de Chapala involucra ambos modelos de especiación, en el que se observa un proceso de hibridación entre dos entidades genéticas aisladas temporalmente y unidas con posterioridad. Actualmente el flujo genético observado en parte del intervalo de distribución estaría determinado por condiciones ecológicas contrastantes, y habiendo interrupción de flujo genético no atribuible a mecanismos de aislamiento precigótico, esperables en los mecanismos de especiación alopátrica. La evidencia de este trabajo es coherente con la influencia relativa de ambos modelos de especiación (Schluter, 2009) y representa un escenario de complejidad en que la separación de los fenómenos históricos y recientes es indispensable para el estudio evolutivo de poblaciones naturales (Thibert Plante and Hendry, 2010). De hecho, la teoría desarrollada en torno a la especiación simpátrica señala que el punto en el cual diferentes grupos pueden ser llamados “especies” es arbitrario. De hecho uno puede considerar que la especiación es la conversión de un concepto de especie biológica a uno de especie genealógica como un proceso continuo resultado de la acumulación de barreras al flujo genético (Coyne

and Orr, 2009). Esto no significa que la selección deba ser ignorada, de hecho las barreras reproductivas probablemente resultan de la acción de la selección natural.

Existen diferentes tipos de barreras reproductivas, cuyo origen se basa en diferentes mecanismos de selección. Lo observado en este estudio puede relacionarse con el desarrollo de barreras reproductivas por aislamiento ecológico, definido como: “las barreras de aislamiento basadas en las diferencias en la ecología de las especies –o grupos genéticos- como productos secundarios de la adaptación a un ambiente determinado” (Orr, 2001). El aislamiento de hábitat se basa por lo general en la imposibilidad de un grupo de individuos de usar el ambiente de otro grupo. Esto puede basarse en diferencias genéticas, en la aptitud biológica asociadas con el uso del hábitat, en la competencia –que “fuerza” a que las especies utilicen diferentes nichos en simpatria o en la habilidad de “encontrar” por locomoción, los hábitats donde los individuos están mejor adaptados (Coyne and Orr, 2004). Posteriores estudios para identificar el mecanismo involucrado en la divergencia observada incluyen: 1) demostrar que la reducción del flujo genético disminuye conforme lo hace también el contacto entre miembros de ambos grupos (es decir, las barreras no son precigóticas); 2) la separación espacial se basa en diferencias genéticas (es decir, no se debe sólo a plasticidad morfológica). Ambos aspectos requieren de hipótesis que pueden probarse tanto en la naturaleza como experimentalmente.

III.2.2 PATRONES MACROEVOLUTIVOS

Los patrones macroevolutivos identificados a partir del análisis cladogenético definieron que la especiación alopátrica es el patrón de especiación más comúnmente observado en el género *Cambarellus*. Así lo indicaban la mayor parte de los eventos de

cladogénesis soportados, al componerse de especies hermanas no simpátricas o especies en simpatria pertenecientes a linajes diferentes (Capítulo 3 de esta tesis). La cladogénesis puede estar relacionada tanto con eventos climáticos como con la formación de las propiedades fisiográficas durante la historia evolutiva de un grupo (Dobzhansky, 1940; Jordan, 1905; Mayr, 1942). Ambos fenómenos fueron coherentes con la diversificación en *Cambarellus*, que mostraron diferentes efectos en los intervalos de distribución del género (Capítulo 3 de esta tesis). La estimación de tiempos de divergencia permite relacionar la historia de la tierra a los mecanismos vicariantes, mismos que promueven la especiación alopátrica.

En este trabajo se postula que los patrones de divergencia en ambos grupos geográficos de *Cambarellus* son diferentes en varios aspectos. En primer lugar, las estimaciones temporales soportan una diversificación más antigua en el Grupo del Golfo que en el Grupo de México. En segundo lugar, la cladogénesis del Grupo del Golfo podría ser más importante y las oscilaciones climáticas, las modificaciones orogénicas haber sido más determinantes para la diversificación de las especies existentes en el Grupo mexicano. La diversidad y configuración actual del género *Cambarellus* pueden ser resultado de importantes eventos de extinción, como ha sido observado en otros grupos de la misma región, a consecuencia del aumento en la desertificación desde el Pleistoceno tardío (Miller and Smith, 1986) y se relacionaría también con la actual separación en la distribución del género entre los cangrejos de Norteamérica y los distribuidos en la Mesa Central de México.

Como se ha expuesto, la diversidad tiene su origen en los patrones microevolutivos, y aquellos por los cuales éstos discurren y se diferencian en el tiempo se identifican con los patrones cladogenéticos. Como se ha mostrado en esta tesis, los

patrones microevolutivos se relacionan con diferentes procesos de anagénesis, entendida como el cambio evolutivo dentro de un linaje (Coyne and Orr, 2004).

REFERENCIAS

- Alaranta, A., Henttonen, P., Jussila, J., Kokko, H., Prestegard, T., Edsman, L., Halmekytö, M., 2006. Genetic differences among noble crayfish (*astacus astacus*) stocks in finland, sweden and estonia based on the its1 region. *Bull. Fr. Pêche Piscic* 380, 965-976.
- Albertson, R., Kocher, T., 2006. Genetic and developmental basis of cichlid trophic diversity. *Heredity* 97, 211-221.
- Albrecht, C., Trajanovski, S., Kuhn, K., Streit, B., Wilke, T., 2006. Rapid evolution of an ancient lake species flock: Freshwater limpets (gastropoda: Ancyliidae) in the balkan lake ohrid. *Organisms Diversity & Evolution* 6, 294-307.
- Allendorf, F., Luikart, G., 2007. Conservation and the genetics of populations. Wiley-Blackwell.
- Baric, S., Höllrigl, A., Füreder, L., Dalla Via, J., 2005. Mitochondrial and microsatellite DNA analyses of austropotamobius pallipes populations in south tyrol (italy) and tyrol (austria). *Bull. Fr. Pêche Piscic* 376, 599-612.
- Baum, D.A., Donoghue, M.J., 1995. Choosing among alternative "Phylogenetic" Species concepts. *Syst. Bot.* 20, 560-573.
- Beroiz, B., Callejas, C., Alonso, F., Ochando, M.D., 2008. Genetic structure of spanish white-clawed crayfish (*austropotamobius pallipes*) populations as determined by rapid analysis: Reasons for optimism. *Aquat. Conserv.: Mar. Freshwat. Ecosyst.* 18.
- Buhay, J., Crandall, K., 2005. Subterranean phylogeography of freshwater crayfishes shows extensive gene flow and surprisingly large population sizes. *Mol. Ecol.* 14, 4259-4273.
- Coblentz, B., 1990. Exotic organisms: A dilemma for conservation biology. *Conserv. Biol.* 4, 261-265.
- Coyne, J., Orr, H., 2004. Speciation. Sinauer Sunderland, MA.
- Coyne, J., Orr, H., 2009. Speciation: A catalogue and critique of species concepts. *Philosophy of biology: an anthology*, 272.

- Diéguez-Uribeondo, J., 2006. The dispersion of the aphanomyces astaci-carrier pacifastacus leniusculus by humans represents the main cause of disappearance of the indigenous crayfish austropotamobius pallipes in navarra. *Bull. Fr. Pêche Piscic* 380, 1303-1312.
- Dobzhansky, T., 1940. Speciation as a stage in evolutionary divergence. *Am. Nat.* 74, 312-321.
- Fetzner Jr, J., Crandall, K., 2003. Linear habitats and the nested clade analysis: An empirical evaluation of geographic versus river distances using an ozark crayfish (decapoda: Cambaridae). *Evolution* 57, 2101-2118.
- Fratini, S., Zaccara, S., Barbaresi, S., Grandjean, F., Souty-Grosset, C., Crosa, G., Gherardi, F., 2005. Phylogeography of the threatened crayfish (genus austropotamobius) in italy: Implications for its taxonomy and conservation. *Heredity* 94, 108-118.
- Fryer, G., 2006. Evolution in ancient lakes: Radiation of tanganyikan atyid prawns and speciation of pelagic cichlid fishes in lake malawi. *Hydrobiologia* 568, 131-142.
- Gil-Sánchez, J., Alba-Tercedor, J., 2006. The decline of the endangered populations of the native freshwater crayfish (<i>austropotamobius pallipes</i>) in southern spain: It is possible to avoid extinction? *Hydrobiologia* 559, 113-122.
- Gouin, N., Grandjean, F., Pain, S., Souty-Grosset, C., Reynolds, J., 2003. Origin and colonization history of the white-clawed crayfish, austropotamobius pallipes, in ireland. *Heredity* 91, 70-77.
- Gouin, N., Grandjean, F., Souty-Grosset, C., 2006. Population genetic structure of the endangered crayfish *austropotamobius pallipes* in france based on microsatellite variation: Biogeographical inferences and conservation implications. *Freshwat. Biol.* 51, 1369-1387.
- Gouin, N., Souty-Grosset, C., Ropiquet, A., Grandjean, F., 2002. High dispersal ability of austropotamobius pallipes revealed by microsatellite markers in a french brook. *Bull. Fr. Pêche Piscic* 367, 681-689.
- Gozlan, R., 2008. Introduction of non native freshwater fish: Is it all bad? *Fish Fish.* 9, 106-115.
- Grandjean, F., Gouin, N., Souty-Grosset, C., Dieguez-Uribeondo, J., 2001. Drastic bottlenecks in the endangered crayfish species austropotamobius pallipes in spain and implications for its colonization history. *Heredity* 86, 431-438.

- Grandjean, F., Harris, D.J., Souty-Grosset, C., Crandall, K.A., 2000. Systematics of the european endangered crayfish species *austropotamobius pallipes* (decapoda: Astacidae). *Journal of Crustacean Biology* 20, 522-529.
- Iaconelli, M., 2001. Struttura genetica del gambero di fiume *austropotamobius italicus* e strategie di conservazione della specie in italia centre con particolare riguardo all'abruzzo., Dipartimento di Scienze Ambientali. Università degli Studi de L'Aquila, Coppito di L'Aquila.
- Jordan, D., 1905. The origin of species through isolation. *Science* 22, 545.
- Kimura, M., Ohta, T., 1978. Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite population. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 75, 2868-2872.
- Koblmüller, S., Sefc, K., Sturmbauer, C., 2008. The lake tanganyika cichlid species assemblage: Recent advances in molecular phylogenetics. *Hydrobiologia* 615, 5-20.
- Largiadier, C.R., Herger, F., Lortscher, M., Scholl, A., 2000. Assessment of natural and artificial propagation of the white-clawed crayfish (*austropotamobius pallipes* species complex) in the alpine region with nuclear and mitochondrial markers. *Mol. Ecol.* 9, 25-37.
- Machino, Y., Füreder, L., Laurent, P.J., Petutsching, J., 2004. Introduction of the white-clawed crayfish *austropotamobius pallipes* in europe. *Ber. Naturwiss.-Med. Ver. Innsbruck* 91, 187-212.
- Manel, S., Schwartz, M.K., Luikart, G., Taberlet, P., 2003. Landscape genetics: Combining landscape ecology and population genetics. *Trends Ecol. Evol.* 18, 189-197.
- Marijnissen, S., Michel, E., Kamermans, M., Olaya-Bosch, K., Kars, M., Cleary, D., Loon, E., Rachello Dolmen, P., Menken, S., 2009. Ecological correlates of species differences in the lake tanganyika crab radiation. *Patterns and Processes of Speciation in Ancient Lakes*, 81-94.
- Mayr, E., 1942. Systematics and the origin of species. Columbia University Press, New York.
- Mayr, E., 1995. Species, classification, and evolution. In: Arai, R., Kato, M., Doi, Y. (Eds.), Biodiversity and evolution. National Science Museum Foundation, Toyko, pp. 3-12.
- McMahon, B.R., 2002. Physiological adaptation to environment. In: Holdich, D.M. (Ed.), Biology of freshwater crayfish. Blackwell Science Ltd., Londres, pp. 327-376.

- Miller, R.R., Smith, M.L., 1986. Origin and geography of the fishes of central Mexico. In: Hocutt, C.H., Wiley, E.O. (Eds.), The zoogeography of north american freshwater fishes. Wiley-Intersciences publication, New York, USA.
- Nyström, P., 2002. Ecology. In: Holdich, D.M. (Ed.), Biology of freshwater crayfish. Blackwell Science Ltd., Londres, pp. 192-235.
- Orr, A., 2001. The genetics of species differences. *Trends Ecol. Evol.* 16, 343-350.
- Pedraza-Lara, C., Alda, F., Carranza, S., Doadrio, I., 2010. Mitochondrial DNA structure of the iberian populations of the white-clawed crayfish, *austropotamobius italicus italicus* (faxon, 1914). *Mol. Phylogen. Evol.* In press.
- Ponniah, M., Hughes, J., 2004. The evolution of queensland spiny mountain crayfish of the genus *euastacus*. I. Testing vicariance and dispersal with interspecific mitochondrial DNA. *Evolution* 58, 1073-1085.
- Santucci, F., Iaconelli, M., Andreani, P., 1997. Allozyme diversity of european freshwater crayfish of the genus *austropotamobius*. *Bull. Fr. Peche Piscic.* 347, 663-676.
- Schluter, D., 2000. Ecology of adaptive radiation. Oxford.
- Schluter, D., 2009. Evidence for ecological speciation and its alternative. *Science* 323, 737.
- Schluter, D., Marchinko, K., Barrett, R., Rogers, S., 2010. Natural selection and the genetics of adaptation in threespine stickleback. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 365, 2479.
- Schultz, M.B., Smith, S.A., Horwitz, P., Richardson, A.M.M., Crandall, K.A., Austin, C.M., 2009. Evolution underground: A molecular phylogenetic investigation of australian burrowing freshwater crayfish (decapoda: Parastacidae) with particular focus on *engaeus erichson*. *Mol. Phylogen. Evol.* 50, 580-598.
- Shaw, K.L., 1998. Species and diversity of natural groups. In: J, H.D., J, B.S. (Eds.), Endless forms: Species and speciation. Oxford University Press, Oxford.
- Shull, H., Perez-Losada, M., Blair, D., Sewell, K., Sinclair, E., Lawler, S., Ponniah, M., Crandall, K., 2005. Phylogeny and biogeography of the freshwater crayfish *euastacus* (decapoda: Parastacidae) based on nuclear and mitochondrial DNA. *Mol. Phylogen. Evol.* 37, 249-263.

- Strong, E., Glaubrecht, M., 2008. Anatomy and systematics of the minute synnolopsine gastropods from lake tanganyika (caenogastropoda, cerithioidea, paludomidae). *Acta Zoologica* 89, 289-310.
- Takhteev, V.V., Rossiter, A., Kawanabe, H., 2000. Trends in the evolution of baikal amphipods and evolutionary parallels with some marine malacostracan faunas. *Adv. Ecol. Res.* Academic Press, pp. 197-220.
- Thibert Plante, X., Hendry, A., 2010. When can ecological speciation be detected with neutral loci? *Mol. Ecol.* 19, 2301-2314.
- Trontelj, P., Machino, Y., Sket, B., 2005. Phylogenetic and phylogeographic relationships in the crayfish genus *austropotamobius* inferred from mitochondrial coi gene sequences. *Mol. Phylogen. Evol.* 34, 212-226.
- Turelli, M., Barton, N.H., Coyne, J.A., 2001. Theory and speciation. *Trends Ecol. Evol.* 16, 330-343.
- Vogt, G., 2002. Functional anatomy. In: Holdich, D.M. (Ed.), *Biology of freshwater crayfish*, Londres, pp. 53-151.
- Von Rintelen, T., Wilson, A., Meyer, A., Glaubrecht, M., 2004. Escalation and trophic specialization drive adaptive radiation of freshwater gastropods in ancient lakes on sulawesi, indonesia. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 271, 2541.
- Wright, S., 1969. *Theory of gene frequencies: Evolution and the genetics of populations*, volume 2. University of Chicago Press, Chicago.
- Zaccara, S., Stefani, F., Galli, P., Nardi, P.A., Crosa, G., 2004. Taxonomic implications in conservation management of white-clawed crayfish (*austropotamobius pallipes*)(decapoda, astacidae) in northern italy. *Biol. Conserv.* 120, 1-10.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

De los estudios llevados a cabo en esta tesis, las siguientes conclusiones pueden ser enunciadas:

1. Los análisis filogeográficos del cangrejo de río *Austropotamobius italicus italicus* indican que existe una estructura genética en la península ibérica que le diferencia de las poblaciones de la subespecie en Italia, por lo que el origen natural de sus poblaciones (en contraparte a su origen por translocación) es una alternativa factible.
2. Los eventos demográficos registrados en las poblaciones de la Península Ibérica y los patrones de variación genética son coherentes con un escenario en que las variaciones climáticas durante el pleistoceno han influido su estructura genética y su distribución de forma compleja, probablemente como resultado de regresiones y expansiones demográficas repetidas.
3. Los datos genéticos nucleares indican la existencia de cuellos de botella recientes en la mayoría de las poblaciones analizadas. Estos procesos de las poblaciones están fuertemente determinados por la deriva hacia el interior cada población, y podrían corresponder con la reducción drástica de las poblaciones observada hace 20 años en España.
4. Los análisis nucleares muestran la existencia de al menos dos grupos genéticos en las poblaciones de cangrejo de río en España y su diferenciación con la población italiana de referencia, aunque se observa una buena cantidad de flujo genético entre las poblaciones españolas, que podría ser el resultado de

dispersión a larga distancia, posiblemente mediado por el hombre. Las medidas de repoblación o refundación de las poblaciones llevadas a cabo con fines de conservación podrían estar relacionadas con el patrón geográfico de variabilidad genética observado.

5. El estudio de la historia evolutiva proveniente del análisis filogenético de la subfamilia Cambarellinae es coherente con un patrón generalizado de especiación en alopatría. Los patrones de cladogénesis entre los dos intervalos geográficos de la subfamilia contrastan en tiempo y factores determinantes, al presentarse en grupo del Golfo de México un patrón cladogenético coincidente con los cambios en los niveles del mar y en el Grupo México con la formación del Eje Neovolcánico Transversal.
6. El estudio de la diversificación de la subfamilia es coherente con un aumento en la tasa de cladogénesis, identificado como una radiación significativa en el Grupo México. Ésta radiación posiblemente se haya asociado a la formación del Eje Neovolcánico Transversal.
7. El análisis del flujo genético entre morfotipos contrastantes (correspondientes a dos especies, *Cambarellus chapalanus* y *Cambarellus prolixus*) indica que hay una interrupción del flujo genético (aunque es intermedio en general) entre poblaciones de ambientes distintos. Es probable que este patrón sea resultado de un mecanismo de aislamiento reproductivo mediado por las diferencias ecológicas entre las poblaciones. La explicación más congruente con este patrón es que se trata de un proceso de divergencia adaptativa que ha mediado la separación entre ambos morfotipos, ya que cumple con las observaciones esperables en un modelo de especiación ecológica.

CONCLUSIONS

.....

CONCLUSIONS

The following conclusions can be stated from the studies conducted in this thesis:

1. Phylogeographic analysis of the crayfish *Austropotamobius italicus italicus* indicate a genetic structure in the Iberian peninsula which differentiates it from the populations of this subspecies in Italy, so the natural origin of their populations (as a counterpart to its origin by translocation) is a feasible alternative.
2. Demographic events recorded in the populations of the Iberian Peninsula and the patterns of genetic variation are consistent with a scenario in which climate changes during the Pleistocene have influenced its genetic structure and distribution, probably related to a complex history of repeated range regression and expansion processes.
3. Nuclear genetic data indicate the existence of recent bottlenecks in most of the populations studied from Spain. These population processes are largely determined by the drift inside each population, and could correspond to the drastic reduction of the populations observed around 20 years ago in Spain.
4. The nuclear analyses show the existence of at least two genetic groups in the crayfish populations in Spain and its differentiation from the reference Italian population, although a good amount of gene flow between populations from Spain, which could be the result of dispersal long distance, has possibly been mediated by man. Conservation measures related to rehabilitation or

reestablishment of populations may be related to the geographical pattern observed.

5. The study of the evolutionary history inferred from the phylogenetic analysis of the subfamily Cambarellinae is consistent with a generalized pattern of speciation in allopatry. Contrasting patterns of cladogenesis between the two Groups in the subfamily were found to involve geographical and time differences. The pattern cladogenetic identified for the Gulf of Mexico Group was coincident with changes in sea levels since Eocene, and the one for the Mexico Group with the formation of Mexican Volcanic Belt.
6. The study of diversification of the subfamily is consistent with an increase in the rate of cladogenesis, which can be identified as a significant radiation in Mexico Group, probably due to the formation of Neovolcanic Transversal.
7. The analysis of gene flow between contrasting morphotypes (corresponding to two species, *Cambarellus chapalanus* and *Cs. proluxus*) indicates that there is an interruption of gene flow among populations from different environments (although intermediate, overall) and is likely a result of ecological differences between populations. The most consistent explanation with this pattern is a process mediated by adaptive divergence between the two morphs, as it meets the expected observations in a model of ecological speciation.